

LAPORAN
PENELITIAN PENGEMBANGAN IPTEKS

**PENENTUAN LAJU PENGURAIAN ALISIN DALAM EKSTRAK DAN FITOSOM
EKSTRAK BAWANG PUTIH SEBAGAI ANTIDIABETES**



Tim Pengusul

Rahmah Elfiyani, M.Farm., Apt.
Anisa Amalia, M.Farm.

NIDN 0310128403 (KETUA)
NIDN 0316018801(ANGGOTA)

Nomor Surat Kontrak Penelitian : 266/F.03.07/2020
Nilai Kontrak : Rp. 15.000.000.-

PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI DAN SAINS
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF.DR.HAMKA
2020

**HALAMAN PENGESAHAN
PENELITIAN PENGEMBANGAN IPTEKS**

Judul penelitian : Penentuan Laju Penguraian Alisin dalam Ekstrak dan Fitosom Ekstrak Bawang Putih sebagai Antidiabete

Ketua peneliti

- a. Nama lengkap : Rahmah Elfiyani
- b. NIDN : 0310128403
- c. Jabatan fungsional : Lektor
- d. Program studi : Farmasi
- e. No.HP : 081310920994
- f. Alamat surel (email) : rahmahelfiyani@uhamka.ac.id

Anggota peneliti (1)

- a. Nama lengkap : Anisa Amalia
- b. NIDN : 0316018801
- c. Perguruan tinggi : UHAMKA

Lama penelitian keseluruhan : 6 bulan

Biaya penelitian keseluruhan : Rp. 15.000.000,-

Mengetahui,

Ketua Program Studi



Kori Yati, M.Farm., Apt.

NIDN. 0324067802

Menyetujui,

Dekan Fakultas Farmasi dan Sains



Dr. Hadi Sunaryo, M.Si., Apt.

NIDN.0325067201

Jakarta, 15 Agustus 20120

Ketua Peneliti



Rahmah Elfiyani, M.Farm., Apt.


NIDN.0310128403

Ketua Lemlitbang UHAMKA

Prof. Dr. Suswandari, M.Pd

NIDN. 0020116601

Surat kontrak



UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF. DR. HAMKA
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
Jln. Tanah Merdeka, Pasar Rebo, Jakarta Timur
Telp. 021-8416624, 87781809; Fax. 87781809

**SURAT PERJANJIAN KONTRAK KERJA PENELITIAN
LEMBAGA PENELITIAN DAN PENGEMBANGAN
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH PROF DR HAMKA**

Nomor : 266/F.03.07/2020
Tanggal : 12 Juni 2020

Bismillahirrahmanirrahim

Pada hari ini, Jum'at, tanggal Dua Belas, bulan Juni, Tahun Dua Ribu Dua Puluh, yang bertanda tangan di bawah ini **Prof. Dr. Suswandari, M.Pd**, Ketua Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA, selanjutnya disebut sebagai **PIHAK PERTAMA**; **RAHMAH ELFIYANI S.SI., APT., M.FARM**, selanjutnya disebut sebagai **PIHAK KEDUA**.

PIHAK PERTAMA dan PIHAK KEDUA sepakat untuk mengadakan Perjanjian Kontrak Kerja Penelitian yang didanai oleh RAPB Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA

Pasal 1

PIHAK KEDUA akan melaksanakan kegiatan penelitian dengan judul : **PENENTUAN LAJU PENGURAIAN ALISIN DALAM EKSTRAK DAN FITOSOM EKSTRAK BAWANG PUTIH SEBAGAI ANTIDIABETES** dengan luaran wajib dan luaran tambahan sesuai data usulan penelitian Bacth 2 Tahun 2019 melalui simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 2

Bukti luaran penelitian wajib dan tambahan harus sesuai sebagaimana yang dijanjikan dalam Pasal 1, Luaran penelitian yang dimaksud dilampirkan pada saat Monitoring Evaluasi dan laporan penelitian yang diunggah melalui simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 3

Kegiatan tersebut dalam Pasal 1 akan dilaksanakan oleh PIHAK KEDUA mulai tanggal 12 Juni 2020 dan selesai pada tanggal 12 November 2020.

Pasal 4

Berdasarkan kemampuan keuangan lembaga, PIHAK PERTAMA menyediakan dana sebesar Rp.15.000.000,- (Terbilang : *Lima Belas Juta*) kepada PIHAK KEDUA untuk melaksanakan kegiatan tersebut dalam Pasal 1. Sumber biaya yang dimaksud berasal dari RAB pada Lembaga Penelitian dan Pengembangan Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA Tahun Anggaran 2019/2020.

Pasal 5

Hak Cipta © <http://simakip.uhamka.ac.id> Tanggal Download: 15-06-2020 Halaman 1 dari 2

Pembayaran dana tersebut dalam Pasal 4 akan dilakukan dalam 2 (dua) termin sebagai berikut;

(1) Termin I 70 % : Sebesar 10.500.000 (Terbilang: *Sepuluh Juta Lima Ratus Ribu Rupiah*) setelah PIHAK KEDUA menyerahkan proposal penelitian yang telah direview dan diperbaiki sesuai saran reviewer pada kegiatan tersebut Pasal 1.

(2) Termin II 30 % : Sebesar 4.500.000 (Terbilang: *Empat Juta Lima Ratus Ribu Rupiah*) setelah PIHAK KEDUA mengunggah laporan akhir penelitian dengan melampirkan bukti luaran penelitian wajib dan tambahan sesuai Pasal 1 ke simakip.uhamka.ac.id.

Pasal 6

(1) PIHAK KEDUA wajib melaksanakan kegiatan tersebut dalam Pasal 1 dalam waktu yang ditentukan dalam Pasal 3.

(2) PIHAK PERTAMA akan melakukan monitoring dan evaluasi pelaksanaan kegiatan tersebut sebagaimana yang disebutkan dalam Pasal 1. Bila PIHAK KEDUA tidak mengikuti Monitoring dan Evaluasi sesuai dengan jadwal yang ditentukan, tidak bisa melanjutkan penyelesaian penelitian dan harus mengikuti proses Monitoring dan Evaluasi pada periode berikutnya.

(3) PIHAK PERTAMA akan mendenda PIHAK KEDUA setiap hari keterlambatan penyerahan laporan hasil kegiatan sebesar 0,5 % (setengah persen) maksimal 20% (dua puluh persen) dari jumlah dana tersebut dalam Pasal 4.

(4) Dana Penelitian dikenakan Pajak Pertambahan Nilai (PPN) dari keseluruhan dana yang diterima oleh PIHAK PERTAMA sebesar 5 % (lima persen)

Jakarta, 12 Juni 2020

PIHAK PERTAMA
Lembaga Penelitian dan Pengembangan
Universitas Muhammadiyah Prof. DR. HAMKA
Ketua,



Prof. Dr. Suswandari, M.Pd
M.FARM

PIHAK KEDUA
Peneliti,



RAHMAH ELFIYANI S.SI., APT.,

Mengetahui

Wakil Rektor II UHAMKA



Dr. ZAMAH SARI M.Ag.

ABSTRAK

Berdasarkan uji aktivitas terbukti bahwa ekstrak bawang putih dapat menurunkan kadar gula darah pada hewan coba. Penggunaan bahan alam sebagai bahan aktif dalam suatu bentuk sediaan umumnya menunjukkan bioavailabilitas yang rendah. Hal tersebut dapat diatasi dengan menggunakan sistem nanoteknologi dalam bentuk fitosom. Fitosom dapat melindungi zat aktif bahan alam dari kerusakan akibat sekresi pencernaan dan bakteri pada usus sehingga penyerapan dan bioavailabilitas obat menjadi lebih baik serta dapat memperbaiki efek farmakologis dan farmakokinetik dari zat aktif tersebut. Namun, membran fitosom sangat rentan mengalami degradasi, fusi, agregasi pada vesikel, sehingga terjadi perubahan distribusi ukuran partikel serta kebocoran atau penguraian bahan yang terenkapsulasi dalam fitosom pada saat penyimpanan sehingga menyebabkan kestabilan menurun dan memiliki umur simpan yang pendek. Penelitian ini bertujuan mendapatkan nilai laju penguraian alisin sehingga dapat menggambarkan seberapa besar kemampuan fitosom untuk mencegah terjadinya penguraian ekstrak bawang putih yang terperap dalam sistem fitosom. Penelitian ini diawali dengan pembuatan ekstrak dan pembuatan fitosom. Selanjutnya penentuan laju penguraian alisin dengan metode uji stabilitas dipercepat menggunakan suhu 4°C, 25°C, dan 40°C, selama 8 minggu. Hasil laju penguraian menunjukkan bahwa fitosom mampu untuk melindungi alisin dalam ekstrak bawang putih yang terperap di dalamnya dibandingkan dengan alisin dalam bawang yang tidak dijerap ke dalam fitosom. Hasil laju penguraian juga menunjukkan bahwa penyimpanan optimal terjadi pada suhu 25°C karena laju penguraian yang diperoleh pada suhu tersebut adalah yang terkecil dibanding dengan 2 suhu lainnya.

Kata kunci :alisin, ekstrak bawang putih, fitosom, kinetika, laju difusi.

DAFTAR ISI

| | |
|--|------|
| HALAMAN SAMPUL | i |
| HALAMAN PENGESAHAN | ii |
| SURAT KONTRAK | iii |
| ABSTRAK | v |
| DAFTAR ISI | vi |
| DAFTAR TABEL | vii |
| DAFTAR GAMBAR | viii |
| DAFTAR LAMPIRAN | ix |
| BAB 1. PENDAHULUAN | 1 |
| BAB 2. TINJAUAN PUSAKA | 4 |
| BAB 3. METODE PENELITIAN | 10 |
| BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 15 |
| BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN | 22 |
| BAB 6. LUARAN YANG DICAPAI | 23 |
| BAB 7. RENCANA TINDAK LANJUT DAN PROYEKSI HILIRISASI | 25 |
| DAFTAR PUSTAKA | 26 |
| LAMPIRAN | 29 |

DAFTAR TABEL

| | |
|--|----|
| Tabel 1. Karakteristik ekstrak bawang putih | 15 |
| Tabel 2. Hasil evaluasi fitosom ekstrak bawang putih | 16 |

.

DAFTAR GAMBAR

| | |
|--|----|
| Gambar 1. Struktur allicin | 5 |
| Gambar 2. Penampang melintang fitosom | 6 |
| Gambar 3. Struktur lesitin | 8 |
| Gambar 4. Hasil kromatografi GC-MS | 16 |
| Gambar 5. Morfologi fitosom ekstrak bawang putih | 18 |
| Gambar 6. Hasil laju penguraian fitosom ekstrak bawang putih | 19 |
| Gambar 7. Hasil laju penguraian ekstrak bawang putih | 19 |

DAFTAR LAMPIRAN

| | |
|-----------------------------|----|
| Lampiran 1. Luaran wajib | 29 |
| Lampiran 2. Luaran tambahan | 44 |

BAB 1. PENDAHULUAN

A. Latar belakang dan permasalahan

Allisin (*diallyl thiosulfinate*) merupakan salah satu komponen biologis yang paling aktif yang terkandung dalam bawang putih. Komponen ini, bersamaan dengan komponen sulfur lain yang terkandung dalam bawang putih berperan pula memberikan bau yang khas pada bawang putih (Londhe *et al.* 2011). Alliin akan berubah menjadi allisin begitu umbi diremas. Allisin bersifat tidak stabil sehingga mudah mengalami reaksi lanjut tergantung kondisi pengolahan atau faktor eksternal lain seperti penyimpanan, suhu, pH, dan lain-lain. Pada bawang putih, katalisis dari alinase membentuk allisin, yang memberikan karakteristik bau pada bawang putih (Hernawan dan Setyawan 2003). Allisin mampu menjadi agen anti-diabetes dengan mekanisme perangsangan pankreas untuk mengeluarkan sekret insulin lebih banyak (Hernawan dan Setyawan 2003). Penelitian yang dilakukan Akter & Rahmatullah (2018) menunjukkan pemberian ekstrak metanol bawang putih pada konsentrasi 400 mg/kgBB mempunyai efek menurunkan kadar glukosa darah mencit. Senyawa ini sangat potensial untuk digunakan dalam terapi pengobatan diabetes, sehingga untuk mengatasi ketidakstabilan allisin maka ekstrak bawang putih diformulasikan dalam sistem fitosom.

Fitosom merupakan suatu teknologi yang dikembangkan dari pembuatan obat dan nutraceutical, untuk menggabungkan ekstrak dari tanaman yang larut di dalam fitokonstituen ke dalam fosfolipid untuk membentuk kompleks molekul lipid. Ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L) dapat dibuat dalam sistem fitosom dengan menggunakan fosfatidilkolin sebagai pembentuk ikatan fosfolipid sehingga dapat meningkatkan stabilitas allisin. Pada saat ekstrak bawang putih (*Allium sativum* L) terjerap di dalamnya, maka kemungkinan allisin untuk terurai semakin rendah (Ramadon and Mun'im 2016). Hal ini terjadi dikarenakan allisin akan terlindungi dari lingkungan eksternal yang dapat memicu proses degradasi allisin. Namun, tingkat kejenuhan fosfatidilkolin yang menyusun membran vesikel fitosom mempengaruhi kestabilan dan kerentanannya terhadap oksidasi selama penyimpanan. Selain itu fosfatidilkolin juga mengandung ikatan ester-gliserol

yang rentan terhadap hidrolisis (Noor 2008). Adapun kekurangan yang dimiliki fosfatidilkolin yaitu rentan mengalami degradasi, fusi, agregasi pada vesikel, sehingga terjadi perubahan distribusi ukuran partikel serta kebocoran bahan aktif yang terperap dalam fitosom pada saat penyimpanan sehingga menyebabkan kestabilan fitosom menjadi rendah dan memiliki umur simpan yang pendek. Selain itu, kekurangan lain fosfatidilkolin adalah memiliki suhu transisi fase pada suhu dibawah 10⁰C ataupun lebih dari 160⁰C (Rowe 2009).

Berdasarkan hal tersebut maka perlu dilakukan penelitian mengenai kinetika penguraian alisin dalam fitosom dan dalam ekstrak.

tujuan penelitian ini adalah untuk

B. Tujuan khusus

Membandingkan nilai laju penguraian allisin dalam ekstrak dengan bentuk fitosom sehingga dapat diketahui seberapa besar kemampuan fitosom untuk mencegah terjadinya penguraian allisin dalam ekstrak bawang putih yang terperap dalam sistem fitosom. Selain itu juga untuk mengetahui suhu penyimpanan fitosom dan ekstrak yang menunjukkan laju penguraian terkecil

C. Urgensi penelitian

Alisin yang terkandung dalam bawang putih dapat menurunkan kadar gula darah sehingga berpotensi digunakan dalam pengobatan diabetes mellitus. Berdasarkan uji aktivitas terbukti bahwa ekstrak bawang putih dapat menurunkan kadar gula darah pada hewan coba. Untuk meningkatkan penerimaan penggunaan ekstrak tersebut dalam pengobatan maka perlu diformulasikan dalam bentuk sediaan.

Permasalahan penggunaan bahan alam sebagai bahan aktif dalam suatu bentuk sediaan adalah rendahnya stabilitas. Allisin bersifat tidak stabil sehingga mudah mengalami reaksi lanjut tergantung kondisi pengolahan atau faktor eksternal lain seperti penyimpanan, suhu, pH, dan lain-lain. Hal tersebut dapat diatasi dengan menggunakan system nanoteknologi dalam bentuk fitosom. Fitosom dapat melindungi zat aktif ekstrak tanaman dari kerusakan, baik kerusakan akibat sekresi pencernaan dan bakteri pada usus ataupun kemungkinan terurai akibat faktor eksternal, sehingga bioavailabilitas obat menjadi lebih baik dan

dapat memperbaiki efek farmakologis dan farmakokinetik, serta memperpanjang umur simpan dari ekstrak tanaman tersebut.

Ekstrak bawang putih yang diformulasikan dalam fitosom diharapkan dapat melindungi alisin dari kerusakan sehingga dapat memperlambat laju penguraian yang akan memperpanjang umur simpan sediaan, dengan demikian fitosom berpotensi untuk diformulasikan dalam bentuk sediaan tertentu yang dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan diabetes.

BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

A. State of the art

Kandungan allisin pada bawang putih (*Allium sativum* L) merupakan senyawa yang berperan aktif sebagai penurun glukosa darah. Lebih lanjut diketahui bahwa ekstrak metanol bawang putih terbukti memiliki aktivitas farmakologi sebagai antidiabetes sehingga berpotensi digunakan dalam pengobatan diabetes melitus. Permasalahan penggunaan bahan alam sebagai bahan aktif dalam suatu bentuk sediaan adalah rendahnya bioavailabilitas yang disebabkan oleh sulitnya ekstrak berpenetrasi melalui membran biologis dan kemungkinan ekstrak untuk terurai semakin besar. Untuk meminimalkan penguraian allisin sebagai senyawa aktif maka dibutuhkan suatu teknologi sistem penghantaran. Salah satu sistem penghantaran bahan alam yang sedang berkembang adalah fitosom.

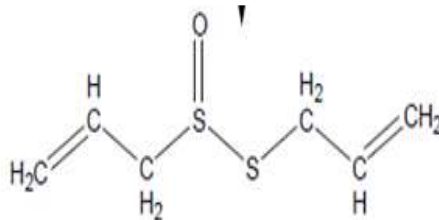
Fitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin. Pada penelitian sebelumnya telah dilakukan optimasi formula fitosom sehingga didapatkan 1 formula optimal. Formula optimal tersebut menunjukkan stabilitas fisik yang cukup baik pada penyimpanan 25°C, dan menunjukkan laju difusi alisin yang lebih besar dibandingkan dengan ekstrak bawang putih.

Salah 1 stabilitas yang penting untuk diketahui sebelum suatu produk digunakan secara luas dalam pengobatan adalah stabilitas kimia. Berdasarkan hal tersebut maka pada penelitian ini akan dilakukan uji stabilitas kimia untuk mendapatkan laju reaksi penguraian dan umur simpan sistem fitosom ekstrak bawang putih.

B. Allisin

Allisin (*diallyl thiosulfinate*) merupakan salah satu komponen biologis yang paling aktif yang terkandung dalam bawang putih. Komponen ini, bersamaan dengan komponen sulfur lain yang terkandung dalam bawang putih berperan pula memberikan bau yang khas pada bawang putih (Londhe *et al.* 2011). Alliin akan berubah menjadi allisin begitu umbi diremas. Allisin bersifat tidak stabil sehingga mudah mengalami reaksi lanjut tergantung kondisi pengolahan atau faktor

eksternal lain seperti penyimpanan, suhu, pH, dan lain-lain. Pada bawang putih, katalisis dari alinase membentuk Allisin, yang memberikan karakteristik bau pada bawang putih (Hernawandan Setyawan 2003). Allisin mampu menjadi agen anti-diabetes dengan mekanisme perangsangan pankreas untuk mengeluarkan sekret insulin lebih banyak (Banerjee dan Maulik 2002).



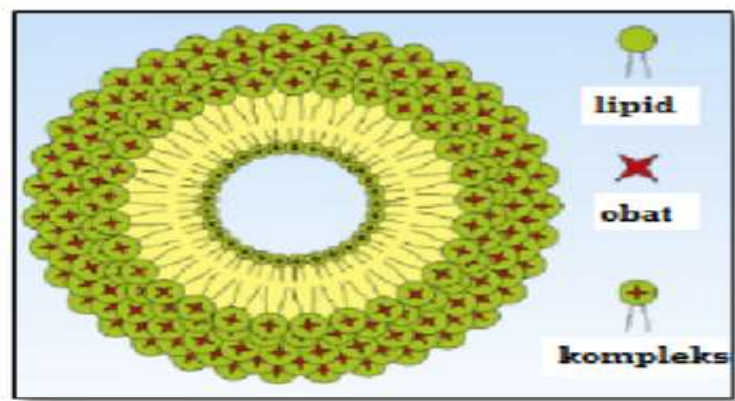
Gambar 1. Struktur Allisin (Hernawan dan Setyawan 2003)

C. Fitosom

Fitosom merupakan suatu teknologi yang dikembangkan dari pembuatan obat dan nutraceutical. Fitosom berasal dari kata “*Phytosome*” yang memiliki arti *phyto* artinya tanaman, dan *some* artinya sel, merupakan suatu teknologi yang dikembangkan dari pembuatan obat dan nutraceutical, untuk menggabungkan ekstrak dari tanaman yang larut didalam fitokonstituen ke dalam fosfolipid untuk membentuk kompleks molekul lipid (Jain *et al.* 2010). Fitosom dibuat untuk meningkatkan bioavailabilitas dari suatu bahan aktif. Bahan aktif yang terkandung dalam tanaman memiliki bioavailabilitas yang buruk karena sebagian besar bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak tanaman mengandung senyawa polar atau larut dalam air dan ukuran molekulnya besar sehingga sulit untuk menembus membran sel yang tersusun atas lipid (Ajazudin 2010). Fitosom dibandingkan dengan formulasi herbal secara konvensional dapat meningkatkan efikasi efek terapeutik karena adanya peningkatan absorpsi dan penetrasi oleh fosfatidilkolin (Agoes 2012). Selain itu juga keuntungan dari fitosom adalah dapat meningkatkan absorpsi senyawa aktif dan adanya ikatan kimia antara fosfatidilkolin dan fitokonstituen menunjukkan stabilitas yang baik (Sharma dan Roy 2010). Nano-fitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin pada

perbandingan molar tertentu (biasanya 1:1 hingga 1:3), sehingga akan menghasilkan suatu kompleks yang ikatannya lebih kuat karena 1 molekul fitokonstituen akan diikat oleh 1 molekul fosfatidilkolin (Karimi *et al.* 2015).

Fitosom memiliki berbagai keuntungan diantaranya dapat meningkatkan absorpsi dari fitokonstituen polar yang tidak larut dalam lipid. Melalui rute oral dan rute topikal menunjukkan bioavailabilitas yang lebih baik serta efek terapi yang lebih besar dan penyerapan obat yang cukup besar. Fosfatidilkolin yang digunakan dalam preparasi fitosom, selain berperan sebagai karier juga dapat berfungsi sebagai hepatoprotektif, oleh karena itu memberikan efek sinergis dengan substansi hepatoprotektif yang ditambahkan. Fitosom menunjukkan profil stabilitas yang lebih baik karena ikatan-ikatan kimia yang terbentuk antara molekul fosfatidilkolin dan fitokonstituen. Fitosom dapat meningkatkan kemampuan suatu substansi untuk melalui membran sel dan masuk ke dalam sel (Amitet *al* 2013).



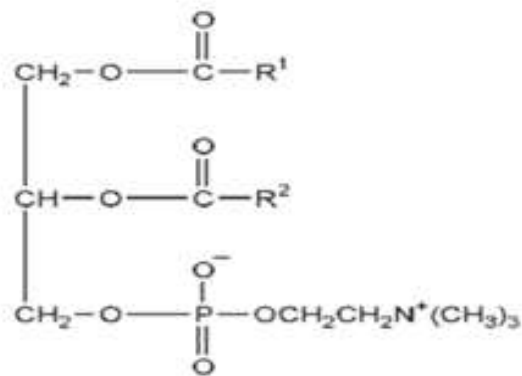
Gambar 2. Penampang melintang fitsom (Sharma dan Roy 2010)

D. Fosfolipid

Fosfolipid merupakan kompleksitas gliserida dengan modifikasi hidroksil termasuk dengan gugus kepala polar membentuk fosfolipid. Fosfolipid diturunkan namanya dari gugus fosfat terikat pada salah satu hidroksil terminal akhir dari gliserol. Gugus fosfat yang bermuatan juga selaku jembatan antara kerangka gliserol dan gugus kepala selanjutnya. Karena sifat amfifatiknya, fosfolipid

digunakan sebagai agen pengemulsi dan pendispersi. Fosfolipid digunakan sebagai komponen utama pembentuk vesikel. Fosfolipid yang digunakan harus berasal dari alam, baik nabati ataupun hewani. Untuk sediaan topikal atau transdermal, biasanya digunakan fosfolipid nabati, karena umumnya fosfolipid hewani (*egg yolk*) menimbulkan bau. Umumnya fosfolipid yang digunakan adalah *soya phosphatidyl choline*, *dipalmitoyl phosphatidyl choline*, *distearoyl phosphatidyl choline*, dan lain-lain (Ramadhan 2015). Salah satu fosfolipid yang berasal dari alam yang dapat digunakan untuk membuat Fitosom adalah fosfatidilkolin. Fosfatidilkolin berasal dari bahasa Yunani *lekithos* yang berarti kuning telur, oleh karena itu nama lain dari fosfatidilkolin adalah lesitin. Lesitin memiliki bahan utama pembentuk vesikel sebagai penghantaran obat ke kulit dikarenakan fosfatidilkolin (lesitin) memiliki struktur yang sama dengan struktur lipid bilayer kulit. Lesitin memiliki struktur fosfolipid yang terdiri dari gugus polar dan non polar yang membentuk susunan lipid bilayer. Lesitin ini akan menjerap obat dan juga kandungan lainnya sehingga akan membentuk vesikel. Fosfatidilkolin dapat ditemukan pada kacang kedelai (1,48 sampai 3,08%), kacang tanah (1,11%), hati anak sapi (0,85%), gandum (0,61%), dan telur (0,39%). Fosfatidilkolin nabati tidak mengandung kolesterol dan tidak berbau, sedangkan fosfatidilkolin hewani mengandung kolesterol dan agak berbau (Mayangkara 2011).

Fosfatidilkolin merupakan golongan dari fosfolipid berupa serbuk hingga padatan berwarna coklat ke kuningan, memiliki rasa hambar dan tidak berbau. Fosfatidilkolin akan memisah pada kondisi pH yang ekstrim, higroskopis dan dapat menjadi sumber degradasi mikroba. Ketika fosfatidilkolin dipanaskan diatas suhu 160°C fosfatidilkolin akan teroksidasi menjadi gelap dan jika disimpan pada suhu dibawah 10°C akan menyebabkan pemisahan (Rowe *et al.* 2009).



Gambar 3. Struktur *lecithin* (Rowe *et al.* 2009).

E. Uji Stabilitas Kimia (Voigt 1995)

Uji stabilitas dipercepat dilakukan dengan menggunakan perlakuan termik. Dalam hal ini peraturan kinetika reaksi dapat dipergunakan, dimana penguraian dipelajari pada suhu tinggi dan tidak pada suhu kamar, yang selanjutnya di ekstrapolasikan pada suhu penyimpanannya. Bahan obat disimpan dalam berbagai suhu yang tinggi tetapi selama percobaan masing-masing suhu dibuat tetap, dan dalam jangka waktu tertentu, konsentrasi produk penguraian atau kandungan bahan aktif ditentukan. Sebagai besaran dasar pertama yang ditentukan adalah ketergantungan kecepatan penguraian akan konsentrasi, yang kedua adalah ketergantungan kecepatan reaksi akan suhu. Tujuan uji stabilitas adalah memberikan bukti bagaimana kualitas bahan obat atau produk obat berubah seiring dengan waktu oleh pengaruh berbagai faktor lingkungan, seperti temperature, kelembapan, dan cahaya serta untuk menentukan periode uji ulang untuk bahan obat atau masa guna produk obat dan kondisi penyimpanan yang dianjurkan. Secara umum telah dikenali bahwa dengan meningkatnya suhu, kecepatan reaksi pun meningkat.

Uji stabilitas dipercepat adalah uji yang dirancang untuk meningkatkan laju degradasi kimia dan perubahan fisika obat dengan membuat suatu kondisi penyimpanan yang dilebihkan. Untuk menentukan ketergantungan kecepatan reaksi akan suhu, harga k ditentukan pada berbagai suhu, paling tidak tiga suhu. Suatu cara khusus yang berguna untuk mengevaluasi kestabilan sediaan adalah mensikluskan antara beberapa temperatur penyimpanan antara lain suhu 4°C dan

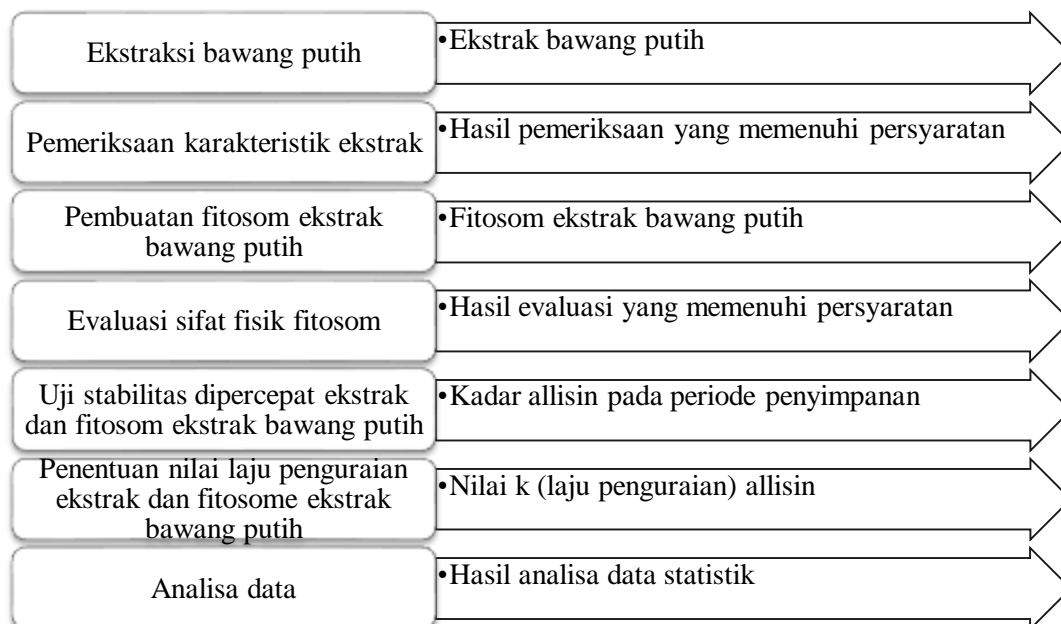
45°C atau yang dikenal dengan nama siklus *freeze thaw* dan suhu ruang 25°C. yang dilakukan selama 8 minggu.

F. Road map



BAB 3. METODE PENELITIAN

A. Diagram alir



B. Alat dan bahan

1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi: Spektrofotometer UV-Vis 1601 (Shimadzu), Neraca Analitik (OHAUS), alat-alat gelas, *Mixer & Homogenizer* (Multimix), pH meter (Metler Toledo), *Ultracentrifuge* (tipe HC1180T), Pengaduk Magnetik, *Vacum Rotary Evaporator*(Buchi), Lemari Pendingin, *Particle Size Analyzer* (Delsa Max), *Transmission Electron Microscopy* (Stubaki), Oven (Memmert), dan *Waterbath* (Memmert)..

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain: *Allium sativum*, Ethanol 70%, Lechytin, Aquadest, *diclorometan*, kalium dihidrogenfosfat, Natrium hidroksida dan Hydrogen disodium fosfat.

C. Pembuatan Ekstrak Bawang Putih

Umbi Bawang putih yang di dapat dideterminasi terlebih dahulu di LIPI Cibinong untuk memastikan spesies yang spesifik. Kemudian bawang putih yang

didapat dicuci bersih, lalu dikeringkan diudara dan dihaluskan dengan menggunakan blender. Selanjutnya digerus menjadi serbuk dan diayak menggunakan pengayak nomor mesh 40-60. Selanjutnya serbuk ditimbang kurang lebih 1000 g dan diekstraksi dengan pelarut etanol 5000 mL menggunakan metode maserasi selama 48 jam. Hasil ekstrak kasar yang diperoleh kemudian disaring dengan menggunakan kertas penyaring whattman No. 1 dan pelarut diuapkan hingga membentuk ekstrak kental dengan menggunakan *Rotary Evaporator* pada suhu 40°C (Akter & Rahmatullah 2018).

D. Evaluasi ekstrak bawang putih

Pemeriksaan organoleptis meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa terhadap ekstrak bawang putih. Penetapan kadar air dilakukan dengan cara destilasi toluen (Departemen Kesehatan RI, 2008). Identifikasi kualitatif alisin dilakukan dengan GCMS, sedangkan penetapan kadar alisin pada ekstrak dilakukan secara spektrofotometer UV-Vis. Selain itu dilakukan penentuan kadar abu total, kadar abu tidak larut asam, dan nilai rendemen.

E. Pembuatan Fitosom

Ekstrak bawang putih dan lesitin ditimbang masing-masing sebanyak 4,5 gram. Lesitin dilarutkan dengan *diclorometan* (pro analysis) sebanyak 50 mL, sedangkan ekstrak bawang putih dilarutkan dengan etanol 96% sebanyak 50 mL dengan cara digerus, lalu kedua larutan tersebut di gerus homogen kemudian dimasukkan ke dalam labu alas bulat. *Diclorometan* diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 30°C dan kecepatan 125 Rpm hingga diperoleh lapisan tipis merata. Kemudian lapisan tipis yang terbentuk disimpan pada suhu 7°C hingga 24 jam. Lapisan tipis itu di hidrasi dengan larutan dapar fosfat pH 5,5 sebanyak 100 mL pada suhu 40°C. Setelah sistem fitosom terbentuk diamkan selama 24 jam kemudian lakukan sonikasi selama 60 menit.

F. Evaluasi fitosom

1. Organoleptis

Pengujian dilakukan seperti yang tertera pada evaluasi ekstrak.

2. Nilai pH (Departemen kesehatan RI 2014)

Pengukuran pH dilakukan dengan menggunakan pH meter pada suhu $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, dengan cara sebagai berikut :Elektroda dicuci dan dibilas dengan air suling kemudian keringkan, Kalibrasi alat menggunakan larutan dapar standar pH 4 dan pH 7.Elektroda dimasukkan ke dalam sampel, catat pH nya. Ulangi sebanyak tiga kali.

3. Bobot jenis(Departemen kesehatan RI 2014)

Pengukuran nilai bobot jenis dilakukan dengan menggunakan piknometer bersih dan telah dikaliberasi dengan menetapkan bobot piknometer dan bobot air yang baru dididihkan pada suhu 25°C . Suhu fitosom di atur lebih kurang 20°C , dimasukkan ke dalam piknometer, buang kelebihan ekstrak cair dan ditimbang, kemudian bobot piknometer yang telah diisi dikurangkan dengan bobot piknometer kosong.Bobot jenis fitosom adalah hasil yang diperoleh dengan membagi bobot ekstrak dengan bobot air, dalam piknometer pada suhu 25°C .

4. Efisiensi penjerapan (Anwar dan Farhana 2018)

Dilakukan dengan memasukkan 0,5 mL sampel kedalam tabung sentrifugasi, kemudian dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan zat aktif yang tidak terserap dalam fitosom pada kecepatan 14000 rpm selama 90 menit. Diambil supernatannya untuk mengukur kadar alisin yang tidak terserap dalam vesikel fitosom. Selanjutnya dicukupkan volumenya dengan Dapar phosfat pH 6,8 10 mL, larutan yang diperoleh diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Presentase alisin yang terjerap ditentukan dengan menggunakan rumus:

$\% \text{ Efisiensi Penjerapan} =$

$$\frac{\text{Total alisin dalam suspensi} - \text{konsentrasi alisin bebas}}{\text{Total alisin dalam suspensi}} \times 100\% \dots\dots(2)$$

5. Ukuran partikel rata-rata, indeks polidispersitas, dan zeta potensial (Keerthi *et al.* 2014)

Dilakukan pengenceran sampel dengan aqudest yaitu 1 mL sampel dicampurkan dengan 9 mL aquadest.Diukur dengan menggunakan *Light Scattering Analyzer DelsaMax Pro Particle Size Analyzer*. Larutan tersebut

dimasukkan ke dalam *flow cell*, *flow cell* yang telah diisi sampel dimasukkan ke dalam *cell* alat. Alat dinyalakan dan dipilih menu DLS & PALS (*Simultaneous*). Alat akan mengukur sampel selama 9 menit, lalu ukuran partikel, Polidispersi Indeks, dan Zeta Potensial dari vesikel fitosom akan terukur.

6. Morfologi partikel

Penentuan morfologi fitosom allisin bawang putih (*Allium sativum* L) dilakukan menggunakan mikroskop elektron TEM (*transmission electron microscopy*). Sampel dilarutkan sebanyak 1 mL dalam 1 mL *aqua pro injection* kemudian di vortex selama 1 menit. Dari larutan tersebut dipipet sebanyak 5 µl pada *carbon copper-coated grid* dan dibiarkan hingga kering. Setelah kering, di teteskan 0,5% uranyl acetate (UA). Kemudian sampel diamati dibawah mikroskop dengan variasi perbesaran sesuai dengan hasil gambar yang di harapkan.

G. Pengujian stabilitas kimia fitosom

1. Penentuan laju penguraian fitosom ekstrak bawang putih

Pada pengujian ini untuk melihat penurunan penguraian allisin dari fitosom bawang putih dengan menggunakan 3 suhu berbeda yaitu 4°C, 25°C dan 40°C. Pengujian dilakukan selama 8 minggu. Prosedur pengujian dilakukan dengan memasukkan 1 mL sampel kedalam tabung sentrifugasi (mikrotube), kemudian dilakukan sentrifugasi untuk memisahkan zat aktif yang tidak terjerap dalam fitosom pada kecepatan 10.000 rpm selama 60 menit. Diambil supernatannya untuk mengukur kadar allisin yang tidak terjerap dalam vesikel fitosom. Selanjutnya dicukupkan volumenya dengan campuran pelarut dapar fosfat pH 6,8 dan etanol 95% hingga 10 mL, pipet 0,5 mL di masukkan kedalam labu ukur 10 mL, dicukupkan volumenya menggunakan pelarut campuran hingga tanda batas. larutan yang diperoleh diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer. Kemudian zat aktif yang terjerap dalam fitosom (presipitat) ditambahkan dengan DCM 0,5 mL, di vortex selama 1 menit. Kemudian dimasukkan kedalam labu ukur 10 mL dan cukupkan volumenya hingga tanda batas. Pipet 0,5 mL di masukkan

kedalam labu ukur 10 ml, dicukupkan volumenya menggunakan pelarut campuran hingga tanda batas.. Kadar allisin yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan model kinetika penguraian orde nol dan orde satu dari laju penguraian fitosom ekstrak bawang putih

2. Penentuan laju penguraian ekstrak bawang putih

Ditimbang dengan seksama ekstrak bawang putih sebanyak 15 mg dilarutkan dengan sebagian campuran pelarut dapar phosfat pH 6,8 dan etanol 95% (8:2), selanjutnya dicukupkan volumenya dengan campuran pelarut 10 mL. Pipet 1 mL di masukkan kedalam labu terukur 10 ml, dicukupkan volumenya menggunakan pelarut campruan hingga tanda batas.larutan yang diperoleh diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengujian dilakukan selama 8 minggu. Kadar allisin yang diperoleh dimasukkan ke dalam persamaan model kinetika penguraian orde nol dan orde satu.

J. Analisa data

Data yang diperoleh yaitu hasil laju penguraian yang terdistribusi normal dan homogen diolah menggunakan uji idependent sample *T-test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan rata-rata antara dua kelompok sampel yang tidak berhubungan, sedangkan data yang tidak terdistribusi normal dan homogen diolah menggunakan analisis *mann whitney*. Analisis ini dilakukan untuk mengetahui perbedaan antara dua kelompok sampel.

BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil Karakteristik Ekstrak

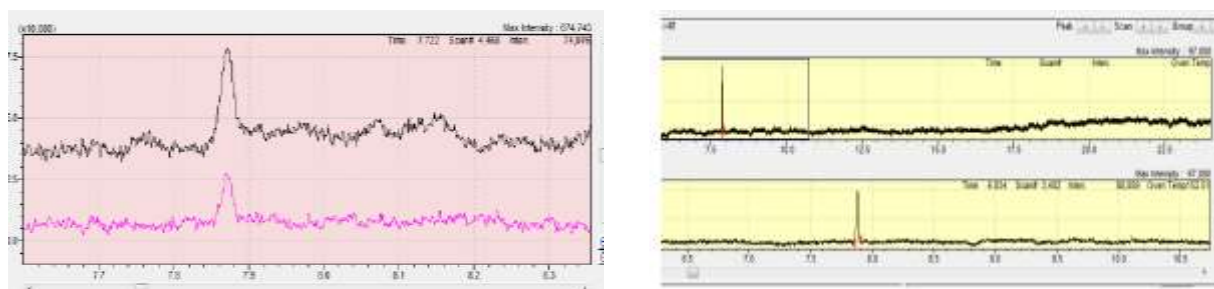
Untuk mengetahui karakterisasi ekstrak bawang putih (*Allium Sativum* L).dilakukan pengujian organoleptik, kadar air, kadar abu total, kadar abu tidak larut asam dan rendemen.Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 1.Karakteristik Ekstrak Bawang putih

| No | Pemerian | Hasil | Syarat |
|----|----------------------------|-------------------------|--------|
| 1. | Bentuk | Ekstrak kental | |
| 2. | Warna | Coklat | |
| 3. | Bau | Khas aromatis menyengat | |
| 4. | Rasa | Pahit | |
| 5. | Kadar Air | 1,21 % | <12% |
| 6. | Kadar abu total | 3,43 % | < 2,7% |
| 7. | Kadar abu tidak larut asam | 0,15 % | < 1% |
| 9. | Rendemen | 15,97 % | |

B. Hasil Analisa Kualitatif Allicin

Pengujian kualitatif allisin menggunakan GC-MS bertujuan untuk mengetahui adanya kandungan senyawa allisin (S-Allyl-2-Propene-1-Sulfinothioate) berdasarkan total ion-ion kromatogram terutama untuk senyawa-senyawa yang mudah menguap.Analisis terhadap hasil kromatogram GC-MS yang ditunjukkan pada Gambar 3, dimana terdapat kesamaan pada puncak antara sampel (ekstrak bawang putih) dengan standar (allisin). Kesamaan puncak tersebut ditandai dengan satu senyawa marker pada *retention time* 7,722 pada Gambar 3 dari ekstrak tersebut yaitu senyawa allisin (S-Allyl-2-Propene-1-Sulfinothioate) yang merupakan senyawa golongan organosulfur.



Gambar 4. Hasil Kromatografi GC-MS

C. Penetapan kadar Allicin dalam ekstrak bawang putih (*Allium Sativum* L)

Penetapan kadar allicin pada penelitian ini digunakan alat Spektrofotometri UV-Vis. Penetapan kadar allicin diawali dengan penentuan panjang gelombang maksimum dan diperoleh panjang gelombang dari allicin yaitu 214,40 nm. Persamaan regresi linier dari kurva kalibrasi allicin adalah $y = -0,0497x + 0,0520$ dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,9982. Berdasarkan persamaan tersebut diperoleh hasil kadar allicin dalam ekstrak kental adalah sebesar 11,2857 %.

D. Evaluasi fitosom ekstrak bawang putih

Hasil evaluasi dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Hasil evaluasi fitosom optimal

| No | Subyek | Hasil |
|----|----------------------|-------------------|
| 1. | Organoleptis | |
| | - warna | Coklat |
| | - Bentuk | Cair |
| | - Bau | Khas bawang putih |
| | - Rasa | Pahit |
| 2. | Bobot Jenis | 1,0051 g/mL |
| 3. | Zeta potensial | -32,55 mV |
| 4. | PDI | 0,571 |
| 5. | Ukuran Partikel | 270 nm |
| 6. | Efisiensi penjerapan | 64,8798 % |

Dari hasil pengukuran dapat dilihat bahwa ukuran partikel fitosom yang diperoleh adalah 270.0 nm. Sehingga dari hasil tersebut fitosom yang

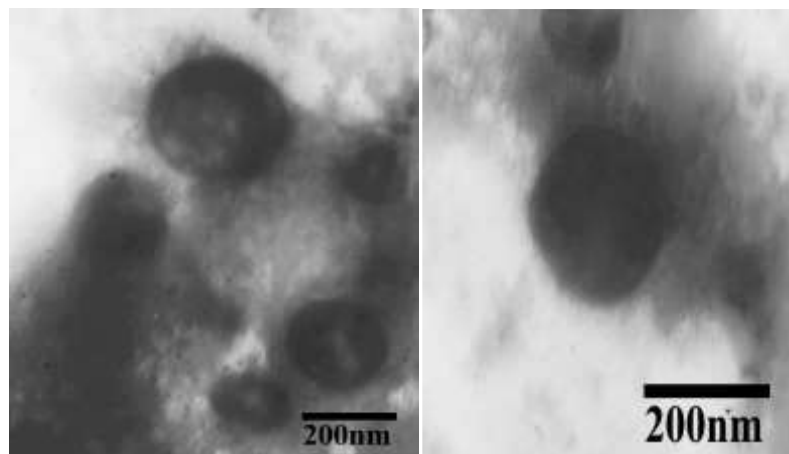
dihasilkan masih termasuk dalam sediaan nanopartikel. Partikel obat yang berukuran kecil dapat mempermudah partikel obat untuk menembus membran (Dash *et al.* 2010). Menurut Anonim(2013) jika nilai % PD kurang dari 0,15 partikelnya dianggap homogen atau *monodisperse* dan jika nilai %PD lebih besar dari 0,35 partikelnya dapat dianggap tidak homogen atau *polydisperse*. Hasil nilai indeks polidispersitas Fitosom adalah 0,571 sehingga fitosom relatif tidak seragam. Nanopartikel dengan nilai zeta potensial mendekati ± 30 mV terbukti stabil, kestabilan suatu sediaan buruk jika nilai zeta potensial kecil dari 30 dan suatu sediaan dikatakan stabil jika nilai zeta besar dari 30 (Mardiyadi E *et al.*, 2012). Dari data yang didapat nilai zeta adalah -32,55 mV, artinya sediaan fitosom dengan nilai zeta yang lebih besar dari 30 mV memiliki kestabilan yang baik.

Zat yang memiliki bobot jenis lebih kecil dari 1,00 lebih ringan dari pada air. Zat yang memiliki bobot jenis lebih besar dari 1,00 lebih berat dari pada air. Dari hasil yang diperoleh bahwa fitosom memiliki Bobot jenis lebih besar dari pada air.

Hasil evaluasi efisiensi penjerapan fitosom allisin bawang putih sebesar 64,8798%. Fitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin pada perbandingan molar tertentu (biasanya 1:1 hingga 1:3), sehingga akan menghasilkan suatu kompleks yang ikatannya lebih kuat karena 1 molekul fitokonstituen akan diikat oleh 1 molekul fosfatidilkolin (Karimi *et al.* 2015). Hasil efisiensi penjerapan yang rendah dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor pada saat pembuatan fitosom menggunakan *vacuum rotary evaporator* meliputi kecepatan, suhu, lamanya pembentukan lapis tipis maupun saat hidrasi, serta konsentrasi lesitin yang kurang cukup untuk mengikat zat aktif tersebut.

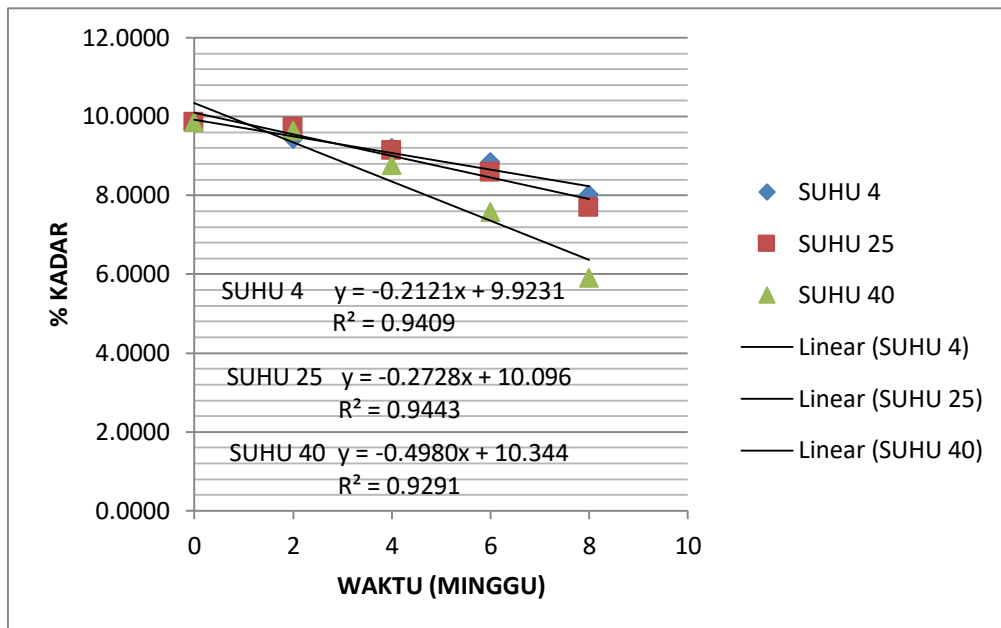
Uji morfologi Fitosom bawang putih dilakukan di lembaga Eijkman Jakarta Pusat. Evaluasi *Transmission Electron Microscope* fitosom diukur untuk melihat bentuk vesikel dan morfologi permukaan vesikel fitosom allisin bawang putih. Tomografi TEM memiliki resolusi yang lebih besar sehingga gambar yang dihasilkan dapat diperbesar lebih banyak. TEM merupakan

teknik mikroskopi dengan prinsip memancarkan sinar elektron, berinteraksi dan mengenai spesimen yang berukuran tipis. Dari interaksi elektron yang ditransmisikan dihasilkan sebuah gambar yang selanjutnya dapat diperbesar, difokuskan pada perangkat gambar seperti lapisan fotografik film. TEM dapat melihat morfologi, struktur hingga level atom. Data hasil morfologi yang didapati dengan perbesaran 30.000 didapati beberapa vesikel bulat namun tidak simetris. Untuk hasil menggunakan alat TEM JEOL JEM 1010 didapatkan hasil bentuk bulat regular dengan bentuk yang bervariasi. Hasil evaluasi *Transmission Electron Microscope* (TEM) dapat dilihat pada Gambar 5.

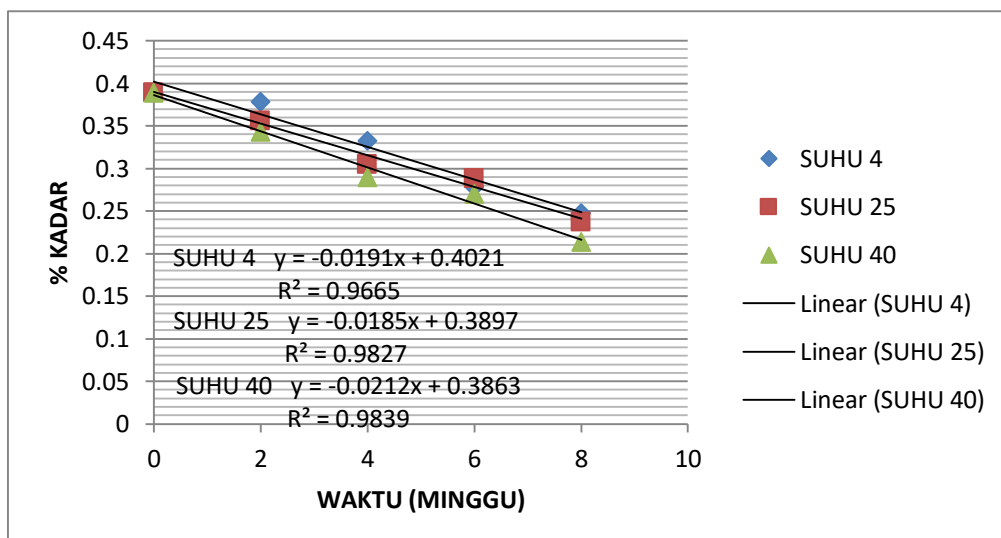


Gambar 5. Morfologi fitosom ekstrak bawang putih

E. Penentuan Laju Penguraian Allisin dalam Bentuk Ekstrak dan Fitosom bawang putih



Gambar 6. Hasil laju penguraian Allisin dalam ekstrak bawang putih



Gambar 7. Hasil laju penguraian Allisin dalam fitosom bawang putih

Seiring lamanya penyimpanan, kadar allisin dalam ekstrak bawang putih semakin menurun. Reaksi akan berlangsung lebih cepat jika diberikan energi dari luar dengan menaikkan suhu. Pada umumnya laju reaksi bertambah menjadi dua kali

setiap kenaikan suhu 10°C. Kinetika orde reaksi allisin baik dalam bentuk ekstrak dan fitosom bawang putih, keduanya mengikuti orde Nol, dimana besarnya laju reaksi tidak di pengaruhi oleh besarnya konsentrasi. Reaksi penguraian lebih cepat karna adanya kenaikan suhu(Sinko 2015).

Laju reaksi penguraian allisin dalam bentuk ekstrak lebih cepat mengalami reaksi penguraian dibandingkan fitosom yang telah di lakukan penyimpanan diberbagai suhu yakni suhu 4°C, 25°C dan 40°C selama 8 minggu dapat dilihat pada gambar 12 dan 13. Hal ini terjadi karena pada sistem Fitosom dibuat dengan mencampurkan fitokonstituen dengan fosfatidilkolin pada perbandingan molar tertentu (biasanya 1:1 hingga 1:3), sehingga akan menghasilkan suatu kompleks yang ikatannya lebih kuat(Karimi *et al.* 2015). Oleh sebab itu allisin yang terdapat dalam fitosom dapat terlindungi oleh adanya fosfatidilkolin. Sedangkan allisin dalam ekstrak tidak memiliki ikatan kompleks sehingga menyebabkan allisin tidak terlindungi yang mengakibatkan allisin dalam ekstrak bawang putih mengalami reaksi penguraian lebih cepat terhadap paparan dari berbagai suhu. Laju penguraian allisin dalam ekstrak bawang putih pada suhu 4°C < 25°C < 40°C, hal ini sesuai dengan literatur bahwa laju reaksi bertambah menjadi dua kali setiap kenaikan suhu 10°C. Sedangkan laju penguraian allisin dalam bentuk fitosom bawang putih pada suhu 4°C > 25°C < 40°C. Pada suhu 4°C laju penguraian allisin lebih besar dibandingkan pada suhu 25°C, hal ini terjadi karena sifat dari Fosfatidilkolin yang akan mengalami pemisahan jika disimpan pada suhu dibawah 10°C(Rowe dkk. 2009).

Berdasarkan analisis statistik, hasil uji statistik terhadap laju penguraian diawali dengan uji normalitas menggunakan Shapiro wilk dan uji homogen. Untuk data laju penguraian allisin dalam ekstrak dan fitosom bawang putih pada suhu 4°C dilakukan uji normalitas pada Shapiro wilk menunjukan nilai sig. untuk fitosom (0,000) dan ekstrak bawang putih nilai sig. 0.286. Dari kedua nilai sig tersebut terdapat < (0,05) yang berarti data tidak terdistribusi normal. Sedangkan untuk uji homogenitas diperoleh sig.0,026. Nilai sig tersebut < (0,05) yang menandakan data juga tidak homogen. Oleh sebab itu akan dilakukan analisis non

parametric, analisis menggunakan man whitny. Pengujian ini dilakukan ketika pengujian Independent T-test tidak dapat digunakan karena adanya asumsi data tidak terdistribusi normal. Hasil dari pengujian diperoleh asymp.Sig. (2-tailed) 0,046. Nilai sig. yang diperoleh $< \alpha$ (0,05) yang berarti H_0 Ditolak . Jadi dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan Laju Penguraian antara Ekstrak dan fitosom Bawang putih terhadap suhu 4⁰C.

Pada data laju penguraian suhu 25⁰C dilakukan analisis statistik pada sampel ekstrak dan fitosom bawang putih, setelah dilakukan analisis Shapiro wilk memperoleh nilai sig. untuk ekstrak 0,874, dan nilai sig. 0,253 untuk fitosom. Dan uji homogenitas diperoleh nilai sig. 0,323. Karna sig $> 0,05$ maka data terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya akan diuji menggunakan analisis Independent sampel T-test. Dari pengujian tersebut diperoleh data nilai sig. (2-tailed) 0,000 untuk ekstrak dan fitosom. Nilai sig. yang diperoleh $< \alpha$ (0,05) yang berarti H_0 Ditolak . Jadi dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan Laju Penguraian antara Ekstrak dan fitosom Bawang putih terhadap suhu 25⁰C.

Selanjutnya dilakukan analisis statistik data pada suhu 40⁰C, pada sampel ekstrak dan fitosom bawang putih, setelah dilakukan analisis Shapiro wilk memperoleh nilai sig. untuk ekstrak 0,939, dan nilai sig 0,600 untuk fitosom. Dan uji homogenitas diperoleh nilai sig 0,155. Karna sig $> 0,05$ maka data terdistribusi normal dan homogen. Selanjutnya akan diuji menggunakan analisis independent sampel T-test. Dari pengujian tersebut diperoleh nilai sig. (2-tailed) 0,000 untuk ekstrak dan fitosom. Nilai sig. yang diperoleh $< \alpha$ (0,05) yang berarti H_0 Ditolak . Jadi dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan secara signifikan Laju Penguraian antara Ekstrak dan fitosom Bawang putih terhadap suhu 40⁰C.

BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa laju reaksi penguraian allisin dalam bentuk fitosom lebih lambat dibandingkan allisin dalam bentuk ekstrak.

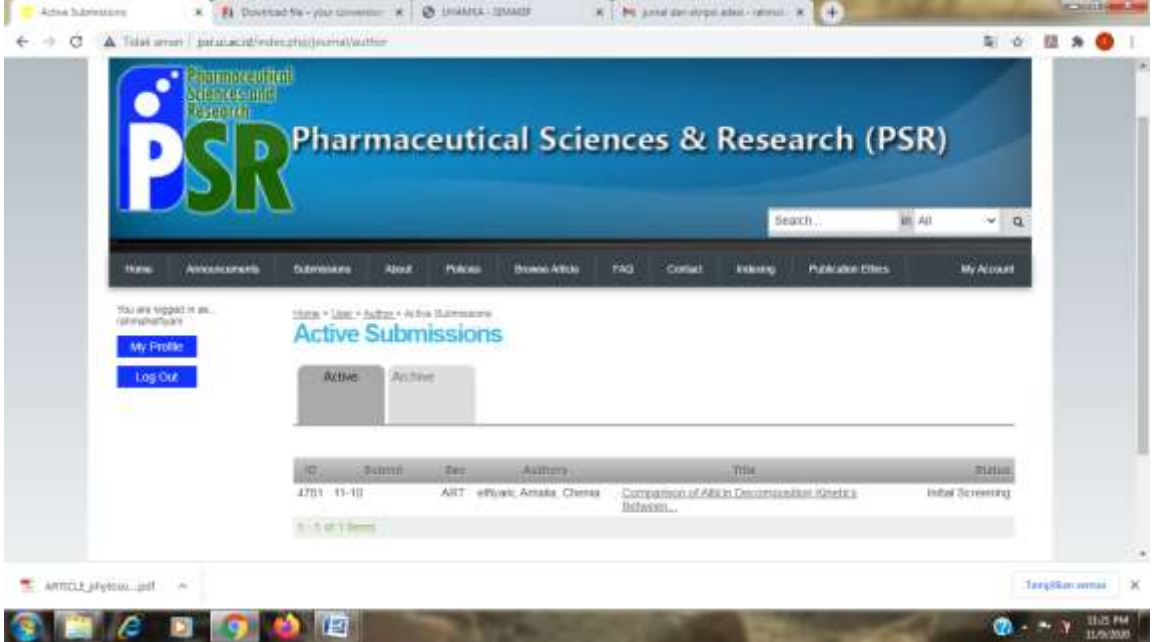
B. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, maka penulis mengharapkan dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji aktivitas dari sistem fitosom tersebut sebagai antidiabetes.

BAB 6. LUARAN YANG DICAPAI

A. Luaran wajib

IDENTITAS JURNAL

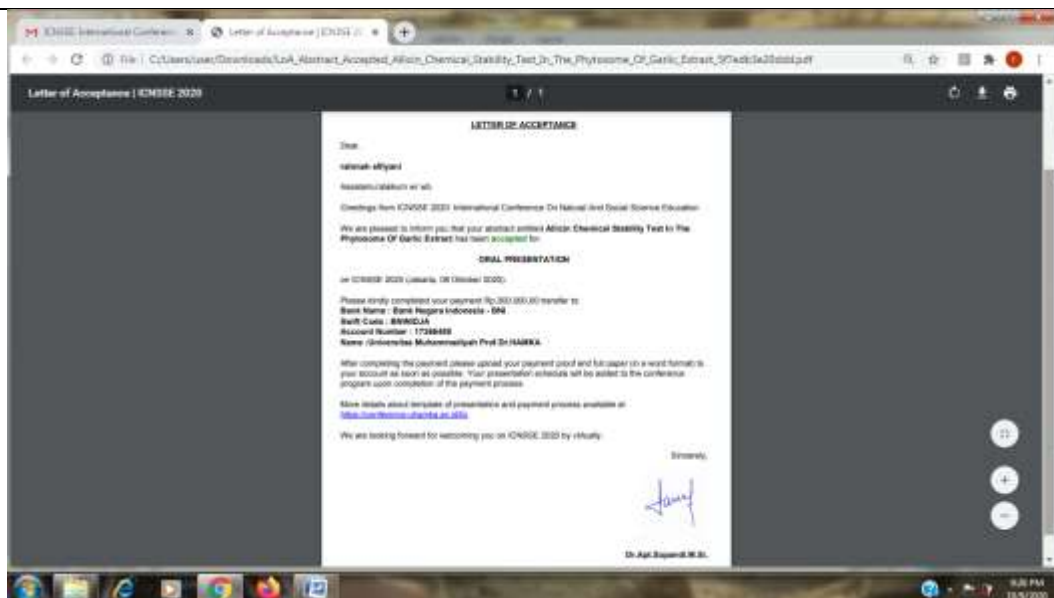
| | | |
|---|------------------------|---|
| 1 | Nama Jurnal | PSR (UI) |
| 2 | Website Jurnal | http://psr.ui.ac.id/index.php/journal |
| 3 | Status Makalah | Awaiting assignment (Lampiran 1) |
| 4 | Jenis Jurnal | Terakreditasi Sinta |
| 5 | Tanggal Submit | 09 November 2020 |
| 6 | Bukti Screenhot Submit |  |

B. Luaran tambahan

IDENTITAS CONVERENCE

| | | |
|---|----------------|---|
| 1 | Nama Jurnal | ICNSSE2020 |
| 2 | Website Jurnal | https://conference.uhamka.ac.id/lic |
| 3 | Status Makalah | Submit (Lampiran 2) |
| 4 | Jenis Jurnal | Proceedings Web of Science Indexed |
| 5 | Tanggal Submit | 07 Oktober 2020 |

6

Bukti Screenhot
Submit

BAB 7. RENCANA TINDAK LANJUT DAN PROYEKSI HILIRISASI

| | |
|-----------------------|--|
| Hasil Penelitian | Penelitian ini adalah bagian dari inovasi produk obat penurun kadar gula darah dengan memanfaatkan sistem penghantaran obat dalam bentuk nanoteknologi (sistem fitosom) yang saat ini penggunaannya dalam terapi pengobatan sudah mulai meluas. Hal ini menunjukkan bahwa nanoteknologi aman untuk digunakan dalam terapi pengobatan. Sebagai contoh, di Eropa nanoteknologi (sistem vesikel) sudah dipergunakan dalam terapi pengobatan kanker. Penelitian yang dilakukan ini masih berada dalam tahap penentuan formula yang menunjukkan stabilitas fisika yang baik, laju difusi yang besar, dan laju penguraian yang lambat. Masih diperlukan penelitian lanjutan untuk menghasilkan produk obat yang aman, berkualitas dan berkhasiat. |
| Rencana Tindak Lanjut | Penelitian ini masih perlu dikembangkan lebih lanjut. Penelitian yang perlu dilakukan untuk menunjang hasil penelitian ini adalah penelitian mengenai uji aktivitas dan toksisitas sistem fitosom. Sistem fitosom telah terbukti dapat meningkatkan laju difusi allisin serta memperlambat laju penguraian allisin. Berdasarkan hasil tersebut diharapkan aktivitas ekstrak bawang putih sebagai penurun gula darah dapat ditingkatkan. Hal ini perlu dibuktikan dengan dilakukannya penelitian lanjutan mengenai uji aktivitas fitosom ekstrak bawang putih. Uji aktivitas akan menunjukkan fitosom ekstrak bawang putih dapat menurunkan kadar gula darah pada hewan coba. Selain itu uji toksistas juga perlu dilakukan untuk memastikan keamanan dan mutu sistem fitosom ekstrak bawang putih. |

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, G. (2012). *Sistem penghantaran obat pelepasan terkendali*. Seri III. Penerbit ITB. Bandung. Hal 237-266.
- Akter, F., & Rahmatullah, M. (2018). Antihyperglycemic Activity Studies With *Malva Verticillata* Leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 7 (19), 107-113.
- Amit, P., Tanwar, Y.S., Rakesh, S., & Poojan, P. (2013). Phytosome: Phytolipid Drug Delivery System for Improving Bioavailability of Herbal Drug. *Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research (JPSBR)*. Vol.3(2), 51-57
- Annajiah W. (2015). Evaluasi Profil Disolusi Sediaan Lepas Lambat Diltiazem Hidroklorida Yang Beredar Di Pasaran. *Skripsi*. FKIK Universitas Islam Negri Syarif Hidayatullah. Jakarta. Hlm. 22-23
- Ansel. (2008). Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi Edisi 4. UI Press. Jakarta. Halaman 376.
- Balamanikandan, T., Balaji, S., & Pandiarajan, J. (2015). Biological Synthesis of Silver Nanoparticles by Using Onion (*Allium cepa*) Extract and Their Antibacterial and Antifungal Activity. *World Applied Sciences Journal*. Vol 33 (6): 939-943.
- Banerjee, S., K., & Maulik, S., K. (2002). Effect of Garlic on Cardiovascular Disorders: a Review. *Nutrition Journal*. Vol. 1 (4), 1-14.
- Dash, S., Murthy, P., N., Nath, L., & Chowdhury, P. (2010). Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Journal Acta Pol Pharm*. Vol. 67(3), 217-222.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (1995). *Farmakope Indonesia*. Edisi IV. Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. Halaman 6.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2008). *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi I. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Halaman 6 - 9, 98-103, 110-111, 150 - 163, 171, 174 - 175.
- Dewi, A., K., Sumarjaya, I., W., & Srinadi, I., G., A., M. (2013). Penerapan Metode Permukaan Respons dalam Masalah Optimalisasi. *E-Jurnal Matematika*. Vol2(2), 32-36
- Garg A, Aggarwal D, Garg S dan Sigla AK. 2002. Spreading of Semisolid Formulation, Pharmaceutical technology.

Hernawan, U. E., & Setyawan, A., D. (2003). Senyawa Organosulfur Bawang Putih (*Allium sativum* L.) dan aktivitas Biologisnya. *Journal Biofarmasi*. Vol. 1(2), 65-76

Hidayat, T., Hidayat, C., Kuntoro, M., D., P., Hastuti, P., & Sumangat, D. (2008). Optimasi Sintesis Metil Oleat Menggunakan Biokatalis Lipase dari Kecambah Biji *Jatropha curcas* L. *Jurnal Pascapanen*. Vol. 5 (2), 1-9.

Londhe, V., P., Gavasane, A., T., Nipate, S., S., Bandawane, D., D., & Chaudhari, P., D. (2011). Role of Garlic (*Allium sativum* L) In Various Diseases: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*. Vol. 1(4), 129-134.

Mardiyadi, E., Muttaqien, S. E., Setyawati, D. R., Rosidah, I., and Sriningsih. (2012). *Preparasi dan Aplikasi Nanopartikel Kitosan sebagai Sistem Penghantaran Insulin Secara Oral*. Prosiding InSINAS MT-25. Halaman 25-30.

Mitkari, B. V., Korde, S. A., Mahadik, K. R., & Kokare, C. R. (2010). Formulation and evaluation of topical liposomal gel for fluconazole. Dalam: *Indian J Pharm Educ Res*. Vol. 44(4), 324-333.

Nazeer, A., A., Veeraiya, S., & Vijaykumar, S., D. (2017). Anti-cancer potency and sustained release of phytosomal diallyl disulfide containing methanolic allium sativum extract against breast cancer. *Int. Res. J. Pharm*. Vol. 8(8). Halaman 34-40.

Nurmiah, S., Syarief, R., Sukarno, Peranginangin, R., & Nurtama, B. (2013). Aplikasi Response Surface Methodology pada Optimalisasi Kondisi Proses Pengolahan Alkali Treated Cottonii (ATC). *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. Vol. 8(1), 9 – 22.

Octavia, N. (2016). Formulasi Sediaan Gel *Hand Sanitizer* Minyak Atsiri Pala (*Myristica fragrans* Houtt.) : Uji Stabilitas Fisik Dan Uji Aktivitas Antibakteri Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Journal*. Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta. Hlm. 1-15

Ramadon, d., and Mun'im A. (2016). Pemanfaatan nanoteknologi dalam sistem penghantaran obat baru untuk produk bahan alam. *Jurnal ilmu kefarmasian Indonesia*. Vol. 14, no. 2. Hlm. 118-127

Rana, M., S., Rohani, S., Hossain, M., N., Rahmatullah, M. (2018). Improved Glucose Tolerance With A Polyherbal Formulation Of *Colocasia Esculenta* Tubers And *Allium Sativum* Cloves. *World Journal of Pharmaceutical Research* (WJPR). Vol 7 (16), 55-61.

Rowe, Raymond C., Marian E., Queen., Paul J., Sheskey. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* 6 th Edition. American Pharmacist Assisition and Pharmaceutical Press : Washington DC and London. Halaman 110-113, 385-387, 441-444, 754-755.

Saha, S., Sarma, A., Saikia, P., & Chakrabarty, T. (2013). Phytosome: A Brief Overview. *Journal Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)*. Vol 2(1), 12-20.

Sayuti, N.A. (2015). *Formulation and Physical Stability of Cassia alata L. Leaf Extrac Gel*. Dalam: Jurnal Kefarmasian Indonesia. Jakarta. Vol.5. Hal 77.

Setiawan, A., S., Yulinah, E., Adnyana, K., Permana, H., & Sudjana, P. (2011). Efek antidiabetes kombinasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum* Linn) Dan rimpang kunyit (*Curcuma domestica* Val.) dengan pembanding Glibenklamid pada penderita diabetes mellitus tipe 2.MKB. Vol 43(1).26-34.

Shaikh H. K., Kshirsagar R. V., & Patil S. G. (2015). Mathematical models for drug release characterization: a review. Dalam: *World J. Pharm. Pharm. Sci*, Vol. 4(4). Mumbai. Hlm. 324-338.

Singla V., Saini S., Joshi B., Rana A.C. (2012). Emulgel : A New Platform For Topical Drug Delivery. Dalam: *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, Vol. 3. 1(01).Punjab. Hlm. 485-498.

Sinko, P., J. (2011). *Martin Farmasi Fisika dan Ilmu Farmasetika edisi 5*. diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. Jakarta : EGC. Hlm 379-383, 498, 513, 514, 537, 538, 114, 145, 151, 154.

Voigt R. (1995). *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi*. Diterjemahkan oleh Soendani N. S. Yogyakarta: UGM Press. Hlm. 116-118, 607-608, 578-583, 609, 613-615.

TEMPLATE

PHARMACEUTICAL SCIENCES AND RESEARCH

Comparison of Allicin Decomposition Kinetics Between Garlic Extract and Phytosomes of Garlic Extract

Rahmah Elfiyani¹, Anisa Amalia¹, and Adesi Chenia¹

¹Faculty of Pharmacy and Science of UHAMKA, Jakarta Timur, DKI Jakarta, Indonesia

rahmahelfiyani@uhamka.ac.id

Abstract

Background: Allicin is an anti-diabetic agent. This compound is unstable so it is easy to decompose. To increase its stability, the allicin contained in the garlic extract is loaded to the phytosome delivery system.

Purpose: The aim of this study was to compare the decomposition kinetics of allicin from garlic extract and phytosomes. **Methods:** The extracts and phytosomes were stored for 8 weeks at 25°C. Furthermore, allicin contains were determined every 2 weeks using a UV-Vis spectrophotometer. **Results:** The decomposition order of allicin in the extract or phytosome was zero order. While the yield of allicin decomposition rate in garlic extract was 0.2728 %/week and the decomposition rate of allicin in the phytosome garlic extract was 0.0185 %/week. **Conclusion:** Based on these results, it can be concluded that the decomposition mechanism of allicin in extracts and phytosomes follows the zero order, and the rate of decomposition of allicin in phytosomes is slower than allicin in garlic extract.

Keywords: decomposition kinetics, allicin, garlic extract, phytosome, order and rate of decomposition

INTRODUCTION

Allicin (diallyl thiosulfinate) is one of the most biologically active components contained in garlic (Londhe et al., 2011). Allicin is capable of being an anti-diabetic agent by stimulating the pancreas to release more insulin secretions (Hernawan and Setyawan, 2003). Previous research has shown that the methanol extract of garlic at a concentration of 400 mg / kg has the effect of reducing blood glucose levels in mice (Akter & Rahmatullah, 2018). This compound is unstable so it is easy to decompose depending on processing conditions or other external factors such as storage, temperature, pH, etc. (Hernawan and Setyawan, 2003). This problem can be overcome by formulating these natural ingredients into a phytosome delivery system. Phytosome is a technology developed from manufacturing drugs and nutraceuticals. Phytosomes compared to

conventional herbal formulations can increase the efficacy of the therapeutic effect because the active ingredients are less likely to decomposition (Ramadon and Mun'im, 2016). However, the phytosome membrane is very susceptible to degradation, fusion, and aggregation in the vesicles, resulting in changes in the particle size distribution and leakage or decomposition of the encapsulated material in the phytosomes during storage, causing decreased stability and short shelf life.

Based on this, the purpose of this study was to compare the value of the decomposition rate of allicin in the extract with the phytosome so that it can be seen how much the ability of the phytosome to prevent the decomposition of allicin in the garlic extract which is entrapped in the phytosome system.

METHODS

Materials

Spectrophotometer UV-Vis 1601 (SHIMADZU), centrifuge (EPPENDORF), *ultrasonic* (NEY), *vacum rotary evaporator* (EYELA), *thmostat syringe GCMC-QP2010* (ULTRA-SHIMADZU), *particle size analyzer* (DELSA MAX), *transmission electron microscopy* (JEOL JEM-1010), *syringe* (TERUMO). pH meter (LaMotte), oven (MEMMERT), karl fischer (METROHM) and refrigerator (LG). Methanol extract of garlic (*Allium sativum* L) and soy *lechylin* (LANSIDA), S-Allyl 2-propane-1-sulfinothioate (*SIGMA ALDRICH*), *ethanol absolute*, *diclorometan* (*Pro analysis*), potassium dihidrogenfosfat, sodium hydroxide, *hydrogen disodium phosfat* (*MERCK*) and aquadest.

Garlic Extract

Bulbs of Garlic are predetermined at LIPI Cibinong to ensure specific species. Then the garlic is washed, then dried in the air and mashed using a blender. Then crushed into a powder and sieved using a mesh number 40-60 sieve. Furthermore, the powder was weighed approximately 1000 g and extracted with 5000 mL methanol using the maceration method for 48 hours. The crude extract obtained was then filtered using Whatman filter paper No 1 and the solvent is evaporated to form a viscous extract using a Rotary Evaporator at 40⁰C (Akter & Rahmatullah, 2018).

Evaluation of garlic extract

Organoleptic examination includes form, color, flavour and taste of garlic extract. The qualitative identification of allicin was carried out by GCMS, while the determination of the

content of allicin in the extract was carried out by a UV-Vis spectrophotometer. In addition, the yield value was also determined.

Phytosome (Anwar dan Farhana, 2018).

A total of 4.5g of lecithin was dissolved with dichloromethane, while 4.5g of garlic extract was dissolved with ethanol, then the two mixtures were put into a round bottom flask. The dichloromethane was evaporated using a rotary evaporator at a temperature of 30⁰C with a speed of 125 rpm and vacuumed until a homogeneous thin layer was obtained. Then the layer was stored in the refrigerator at 2-8⁰C for up to 24 hours. The thin layer was hydrated with a phosphate buffer solution pH 5.5 at 40⁰C. After the suspension is formed, sonication for 60 minutes, then put it in a glass bottle.

Evaluation of Phytosome

Organoleptic

The test was carried out as stated in the extract evaluation.

Value of pH (Departemen kesehatan RI, 2014)

Measurements of pH are carried out using a pH meter at a temperature of 25⁰C \pm 2⁰C, in the following manner: The electrodes are washed and rinsed with distilled water then dry, Calibrate the pH meter using standard buffer solutions of pH 4 and pH 7. The electrode is inserted into the sample, record the pH.

Density (Departemen kesehatan RI, 2014)

Density measurements are carried out using a pycnometer which has been calibrated by setting the pycnometer weight and water weight. The temperature of the phytosome is set to approximately 20 ° C, put into the pycnometer, remove excess liquid extract and weigh it, then the weight of the pycnometer that has been filled is subtracted from the empty pycnometer weight. Phytosome density is the result obtained by dividing the weight of the extract by the weight of water, in a pycnometer at 25 ° C.

Entrapment efficiency (EE)

A total of 1 mL of sample is inserted into the centrifugation tube, then centrifuged to separate the active substances that are not absorbed in the phytosomes at a speed of 10000 rpm for 60 minutes. The supernatant is taken and the volume is sufficient with a solvent mixture of phosphate buffer pH 6.8 and ethanol 95% (8: 2) to 10 mL, then pipette 0.5 mL and put into a 10 ml measuring flask, insufficient the volume using a capable solvent to mark limit. The solution

obtained was measured its absorbance using a UV-Vis spectrophotometer with a wavelength of 214.40 nm. The level of allicin obtained is the content of free allicin (CFA). Then the active substance that is entrapped in the phytosome (precipitates) is added with 0.5 mL dichloromethane, vortexed for 1 minute. Then put in a 10 mL measuring flask and sufficiently volume with the mixed solvent to mark the limit. The 0.5 mL pipette is put into a 10 mL measuring flask, the volume is sufficient using a suitable solvent to the limit mark. The solution obtained was measured its absorbance using a UV-Vis spectrophotometer and the level of allicin obtained is the content of entrapped allicin (CEA). The percentage of entrapment efficiency is determined directly using the equation:

$$\% EE = \frac{CEA}{CEA + CFA} \times 100\%$$

Particle size, polidispersity index, and zetta potential (Keerthi et al., 2014)

The sample was diluted with aquadest, 1 mL of the sample was mixed with 9 mL of aquadest. Measured using a DelsaMax Pro Particle Size Analyzer Light Scattering Analyzer. The solution is inserted into the flow cell, the flow cell that has been filled with samples is inserted into the instrument. The instrument will measure the sample for 9 minutes, then the particle size, the Polidispersity Index (PDI), and the Zetta Potential will be measured.

Particle morphology with transmission electron microscopy (TEM)

A sample of 1 mL was dissolved in 1 mL of aqua pro injection then vortexed for 1 minute. From this solution, pipettes 5 µl on a carbon copper-coated grid and allowed to dry. Once dry, drop 0.5% uranyl acetate (UA). Then the sample is observed under a microscope with various magnifications in accordance with the expected image results.

Decomposition Rate

In this test, to see a decrease in the decomposition of allicin from the phytosome of garlic extract at 25⁰C. The test was carried out for 8 weeks. The test procedure is the same as the entrapment efficiency. The allicin content obtained was entered into the equation of the zero and first order decomposition kinetics model, after which it was continued with the determination of the decomposition rate of allicin in the phytosome of the garlic extract.

In addition, this test is also to see a decrease of allicin content in garlic extract at 25⁰C. Weighed carefully the garlic extract as much as 15 mg, then dissolved with a solvent mixture (8 parts of pH 6.8 phosphate buffer and 2 parts of 95% ethanol) up to 10mL. Pipette 1mL and put into a flask measuring 10ml, the volume is adjusted using a solvent mixture. The solution obtained was measured for its absorbance using a UV-Vis spectrophotometer. The test was carried out for 8 weeks. The allicin content obtained were entered into the equation of the zero and first order decomposition kinetics model.

Data Analysis

The evaluation which was analyzed statistically was the decomposition rate. The data obtained were normally distributed and homogeneous and were processed using the independent sample T-test to determine whether or not there was an average difference between the two unrelated sample groups.

RESULTS AND DISCUSSION

Extract Characteristics

To determine the characterization of garlic extract (*Allium Sativum* L), evaluation of organoleptic and yield were carried out. The results obtained can be seen in Table 1.

Qualitative testing of allicin using GC-MS aims to determine the presence of allicin compounds (S-Allyl-2-Propene-1-Sulfinothioate) based on the total chromatogram ions, especially for volatile compounds. Figure 1 showed the similarity at the peak between the sample (garlic extract) and the standard (allicin). The similarity of the peak is indicated by one marker compound at the retention time of 7,722 from the extract, namely the allicin compound (S-Allyl-2-Propene-1-Sulfinothioate) which is a compound of the organosulfur group.

UV-Vis spectrophotometry was used to determine the content of allicin in this study, which began with the determination of the maximum wavelength followed by the allicin calibration curve. Obtained wavelength of allicin is 214.40 nm, the linear regression equation of the allicin calibration curve is $y = -0.0497 x + 0.0520$ with a correlation coefficient value of 0.9982. Based on this equation, the results of allicin content in viscous extract was 11.2857%.

Evaluation of Phytosome (Table 2)

The particle size obtained from the phytosome suspension was 270.0 nm. According to Agoes (2010), the size of the nanoparticles is 1-300 nm. From the results obtained, the particle size is

included in the size range of the nanoparticle system. Nanoparticles with a zetta potential value of ± 30 mV were shown to be stable (Maryadi E et al., 2012). The stability of a suspension is good if the zetta potential value is greater than 30 and if the zetta potential value is less than 30 it is said to be unstable. The positive (+) and negative (-) values of the zetta potential indicate the outer charge of the particle. From the data obtained, the zeta potential was -32.55 mV, meaning that the phytosome preparation with a zeta value greater than 30 mV has good stability, and the phytosome has a negative charge on its surface caused by ionized phospholipids to form OH⁻ when dispersed in aquadest. The polydispersity index (PDI) describes the width of the nanoparticle size distribution. PDI with a value less than 0.15 indicates a homogeneous particle size distribution. Meanwhile, the PDI value is more than 0.35 which means that the particle size distribution is not homogeneous (Anonymous 2013). From the results obtained, the PDI value is 0.571 which means that the particle size distribution of the phytosome suspension is not homogeneous.

The results of the analysis using TEM showed that the phytosome of the garlic extract was produced in the form of regular round vesicles with varying sizes. In Figure 2 with a magnification of 30000 times, you can see some asymmetrical round vesicles. For the results using the TEM JEOL JEM-1010, the results of the formation of vesicles showed that there was a complex between phosphatidylcholine and allicin from garlic extract.

Decomposition Rate Test

Evaluation of the decomposition rate of allicin in the form of garlic extract and phytosomes was carried out for 8 weeks by taking samples at 0, 2, 4, 6 and 8 weeks. Over the long storage time, allicin contents, both in the extract and phytosome of garlic, decreased. Allicin which decomposes on the phytosome of garlic extract is most likely free allicin, based on the % EE value that allicin in garlic extract that can be entrapped in the phytosome is only 64.88%. Another possibility that allicin decomposition from phytosomes is the breakdown of lecithin which causes the walls of the phytosome vesicles to break down and release allicin. Lecithin which is a phosphatidylcholine compound is a compound that is easily oxidized and hydrolyzed in the aqueous system. Oxidation can be minimized by reducing the amount of oxygen in the system, while hydrolysis can be avoided by removing water, namely by lyophilizing the phytosome liquid disperse to produce phytosome solids (Werling et al., 2008).

The kinetics of the allicin decomposition reaction order in the form of garlic extract and phytosomes follows the Zero order which illustrates that the magnitude of the reaction rate is not influenced by the amount of concentration (Sinko, 2015). The presence of lecithin as a component of phytosome vesicle wall formation does not change the allicin reaction order, lecithin itself is hydrolyzed following the pseudo 1st order (Werling et al., 2008).

The decomposition reaction rate of allicin in extracts is faster than phytosomes. This happens because the phytosome system is made by mixing phytoconstituents with phosphatidylcholine at a certain molar ratio (usually 1: 1 to 1: 3), so that it will produce a complex with a stronger bond (Karimi et al., 2015). The main interaction that occurs between phosphatidylcholine-substrates is the formation of hydrogen bonds between the polar heads of phosphatidylcholine (i.e. the phosphate and ammonium groups) and the polar functionality of the substrate, for example in the catechindistearoyl phosphatidylcholine complex, the formation of hydrogen bonds occurs between the phenolic hydroxyl from the flavone and the phosphate ion on the side phosphatidylcholine (Jain et al., 2010). Therefore allicin contained in the phytosome can be protected by the presence of phosphatidylcholine. Meanwhile, allicin in the extract does not have a complex bond that causes allicin to be unprotected so that it undergoes a faster decomposition reaction. Allicin is a precursor for the formation of allil sulfide, this compound when stored at temperatures of more than 25C or for a long time will cause a decrease in allicin levels due to the loss of the allinase enzyme performance needed in the formation of these compounds (Hernawan and Setyawan, 2003).

The results of statistical analysis of the decomposition rate of garlic extracts and phytosomes obtained sig value data. (2-tailed) 0,000. Sig value obtained < 0.05, which means that there is a significant difference in the rate of decomposition of allicin between the extract and the phytosome of garlic. This shows that the entrapment of garlic extract containing allicin into the phytosome is effective enough to slow the decomposition of allicin.

CONCLUSION

Based on these results, it can be concluded that the decomposition mechanism of allicin in extracts and phytosomes follows the zero order, and the decomposition rate of allicin in phytosomes is slower than allicin in garlic extract.

ACKNOWLEDGMENT

This research was supported by a grant from the LEMLITBANG UHAMKA with contract number 266/F.03.07/2020.

REFERENCES

- Agoes, G. (2012). *Sistem penghantaran obat pelepasan terkendali*. Seri III. Penerbit ITB. Bandung.
- Akter, F., & Rahmatullah, M. (2018). Antihyperglycemic Activity Studies With *Malva Verticillata* Leaves. *World Journal of Pharmaceutical Research*. Vol 7 (19), 107-113.
- Anonim. (2013). DelsaMax Analysis Software Instruction For Use Version 1. USA: Beckman Coulter.
- Anwar E, Farhana N. (2018). Formulation and Evaluation of Phytosome-Loaded Maltodextrin-Gum Arabic Microsphere System for Delivery of *Camellia sinensis* Extract. *Journal of Young Pharmacists*. Vol. 10(2S) : s56-s62
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. (2014). *Farmakope Indonesia*. Edisi V Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- Hernawan, U.. E., & Setyawan, A., D. (2003). Senyawa Organosulfur Bawang Putih (*Allium sativum* L.) dan aktivitas Biologisnya. *Journal Biofarmasi*. Vol.1 (2), 65-76
- Jain N, Brahma PG, Navneet T, Ruchi J, Jitendra B, Deepak KJ, Surendra J. (2010). Phytosome: A Novel Drug Delivery System for Herbal Medicine. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*; 2(4): 224-228
- Karimi N, Ghanbarzadeh M, Hamishehkar H, Pezeshki A, Mostafayi H, Gholian MM. (2015). Phytosome as novel delivery system for nutraceutical materials. *International Journal Curr Microbiol App Sci*. Vol. 4(6), 152-159
- Keerthi B, Pingali PS, Srinivas P. (2014). Formulation and evaluation of capsules of ashwagandha phytosomes. *Int J Pharm Sci Rev Res*. Vol. 29(2), 138-142
- Londhe, V., P., Gavasane, A., T., Nipate, S., S., Bandawane, D., D., & Chaudhari, P., D. (2011). Role of Garlic (*Allium sativum* L) In Various Diseases: An Overview. *Journal of Pharmaceutical Research and Opinion*. Vol. 1(4), 129-134.

Mardiyadi, E., Muttaqien, S. E., Setyawati, D. R., Rosidah, I., and Sriningsih.(2012). Preparasi dan Aplikasi Nanopartikel Kitosan sebagai Sistem Penghantaran Insulin Secara Oral. *Prosiding InSINAS MT-25*. pp25-30.

Ramadon, d., and Mun'im A. (2016). Pemanfaatan nanoteknologi dalam sistem penghantaran obat baru untuk produk bahan alam. *Jurnal ilmu kefarmasian Indonesia*. Vol. 14, no. 2 : 118-127

Sinko, P., J. (2011). *Martin Farmasi Fisika dan Ilmu Farmasetika edisi 5*. diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. Jakarta : EGC.

Werling J, Sabine G, Heather O, Lakshmy N, Thomas G, Phillip WC. (2008). Physicochemical stability of phospholipid-dispersed suspensions of crystalline itraconazole. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69 : 1104–1113

Table 1. Characterization of Garlic Extract

| No | Parameter | Result |
|-----------|------------------|-----------------|
| 1. | Form | Viscous extract |
| 2. | Colour | Brown |
| 3. | Flavor | Aromatic |
| 4. | Taste | Bitter |
| 5. | Yield value | 15,97 % |

Table 2. Result of Phytosome

| No | Parameter | Result |
|----|-----------------------|-------------------|
| 1. | Organoleptic | |
| | - Colour | Brown |
| | - Form | Liquid |
| | - Flavour | Typical of garlic |
| | - Taste | Bitter |
| 2 | Value of pH | 5,5 |
| 3. | Density | 1,0051 g/mL |
| 4. | Zetta potensial | -32,55 mV |
| 5. | PDI | 0,571 |
| 6. | Particle size | 270 nm |
| 7. | Entrapment efficiency | 64,88 % |

Table 3. Allicin Content

| Time (week) | Garlic extract (%)* | Phytosome of garlic extract (%)* |
|-------------|---------------------|----------------------------------|
| 0 | 9,8559±0,0300 | 0,3894±0,0085 |
| 2 | 9,7296±0,0198 | 0,3564±0,0111 |
| 4 | 9,1486±0,0518 | 0,3051±0,0144 |
| 6 | 8,5926±0,0405 | 0,2887±0,0079 |
| 8 | 7,6958±0,0442 | 0,2376±0,0047 |

*n=3

Table 4. Decomposition kinetics of Allicin in garlic extract and phytosome

| Sampel | Order of reaction | Parameter* | |
|---------|-------------------|---------------------|---------------------|
| | | K | R |
| Fitosom | Orde nol | $0,0185 \pm 0,0015$ | $0,9862 \pm 0,002$ |
| | Orde satu | $0,0599 \pm 0,0048$ | $0,9826 \pm 0,0064$ |
| Ekstrak | Orde nol | $0,2728 \pm 0,0035$ | $0,9715 \pm 0,0012$ |
| | Orde satu | $0,0313 \pm 0,0005$ | $0,9644 \pm 0,0017$ |

*n=3

Figures

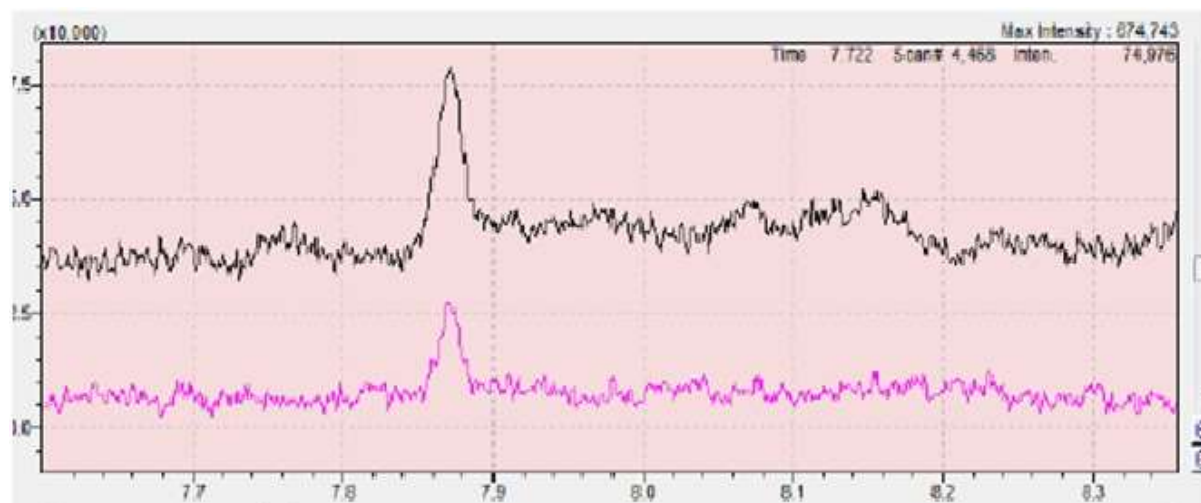


Figure 1. Chromatogram of GC-MS: (black) allicin standart, and (pink) garlic extract

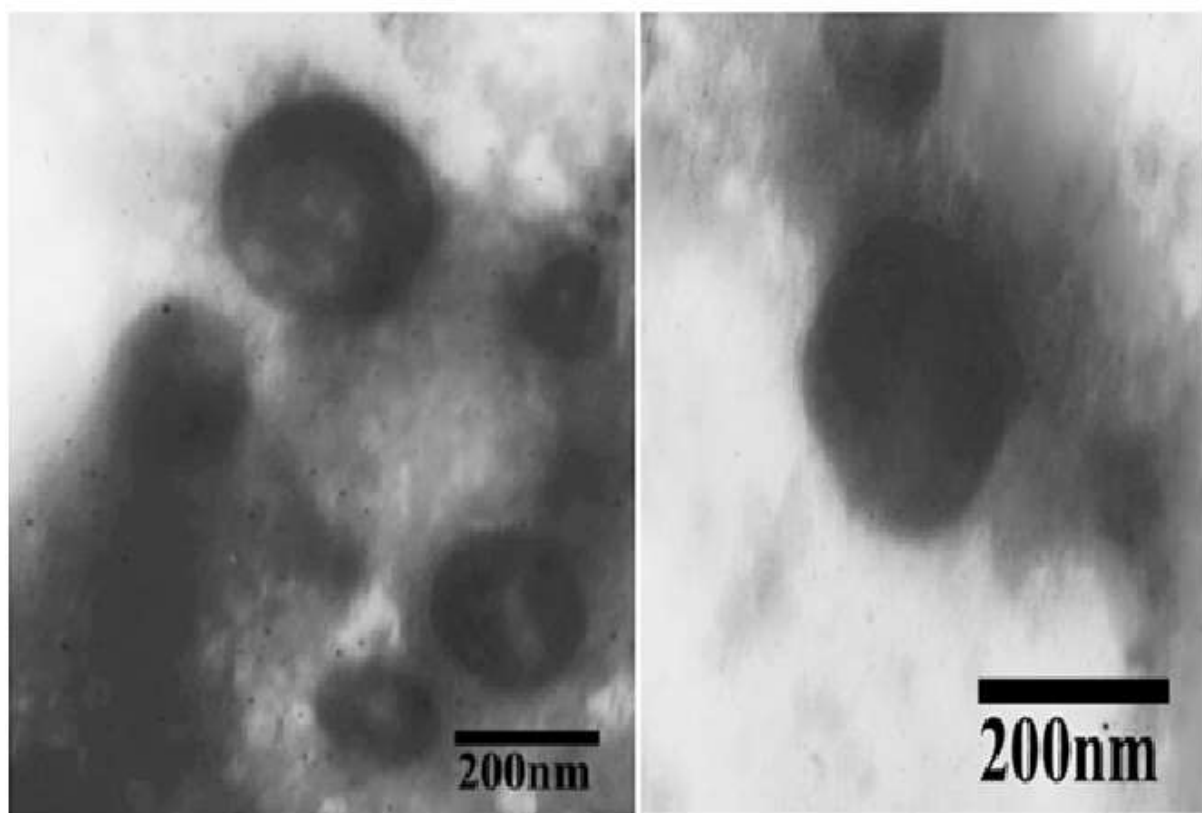


Figure 2. Result of particle morphology with *Transmission Electron Microscope* (TEM)

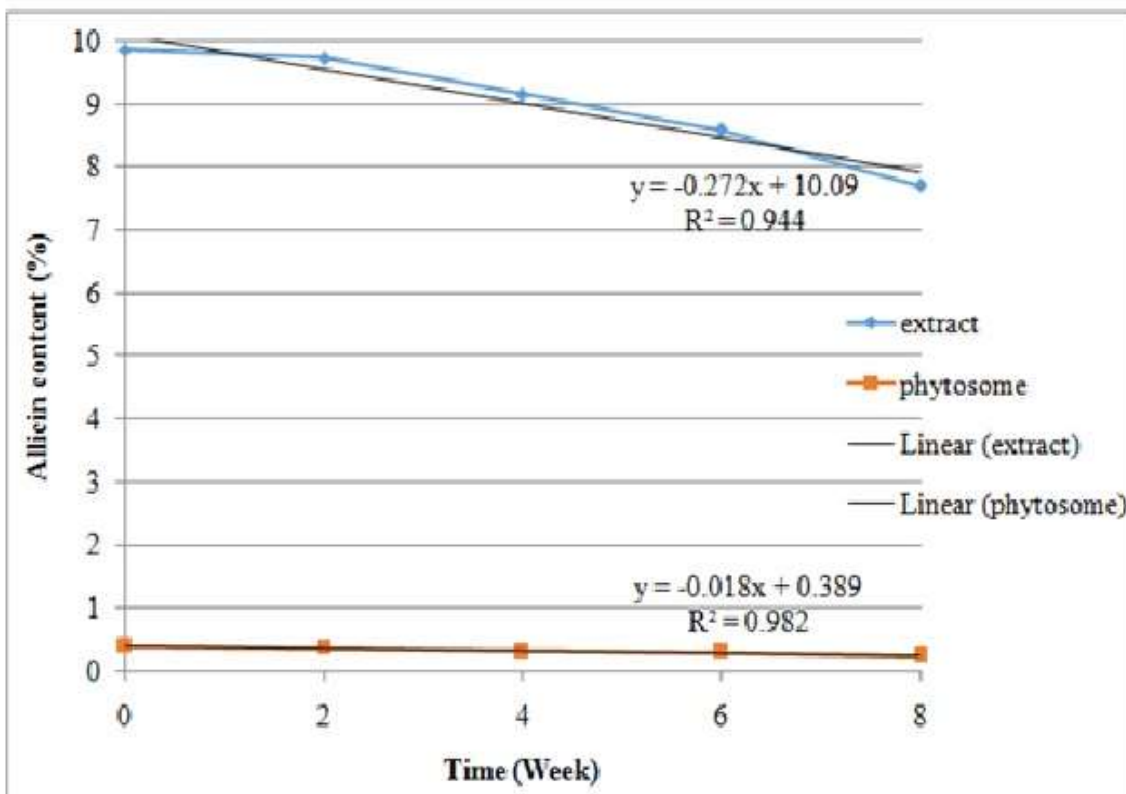


Figure 3. Decomposition rate of alliin

Lampiran 2. Luaran tambahan

Allicin Chemical Stability Test In The Phytosome Of Garlic Extract (*Allium sativum* L)

Rahmah Elfiyani^{1, a)}, Anisa Amalia^{1, b)}, and Adesi Chenia^{1, c)}

¹⁾*Phaculty of Pharmacy and Sciences, UHAMKA, Jakarta, Indonesia*

^{a)}Corresponding author: rahmahelfiyani@uhamka.ac.id

^{b)}anisa.amalia@uhamka.ac.id

^{c)}adesichenia97@gmail.com

Abstract. Allicin contained in garlic extract is unstable at high temperatures. Meanwhile, this compound has the potential to be widely used as an antidiabetic. One way to optimize the use of allicin is by using a phytosome delivery system that can protect allicin so that it does not degradation easily. The purpose of this study was to determine the storage temperature which indicates the slow rate of degradation of allicin in the phytosomes of garlic extract (PGE). PGE were stored for 8 weeks at 4°C, 25°C and 40°C. Allicin content were measured every 2 weeks using a UV-Vis spectrophotometer. The results of the degradation rate of allicin in PGE at temperatures of 4°C; 25°C; 40°C were 0.0191; 0.0185; 0.0212, respectively. Based on these results, it can be concluded that the storage temperature of 25°C showed the degradation rate of allicin in the PGE is slower than the other storage temperatures.

Keywords: allicin, chemical stability, phytosome, garlic extract, degradation rate

Introduction

The use of plants as medicinal materials has become the culture of almost every country in the world. One of the plants that has medicinal properties is garlic (*Allium sativum* L) which contains allicin (diallyl thiosulfonate or diallyl disulfide) (Setiawan et al. 2011) [1]. Previous research showed that giving garlic methanol extract at a concentration of 400 mg / kgBW has the effect of reducing blood glucose levels in mice (Rana et al., 2018) [2]. The problem of using natural ingredients as an active ingredient in a dosage form is the low stability because the extract is easily broken down. This problem can be overcome by formulating these natural ingredients into a drug delivery system. One of the delivery systems that can be used is phytosomes.

Phytosome is a technology developed from manufacturing drugs and nutraceuticals. Phytosomes can entrapped natural materials, most of which are hydrophilic so that they can be used to increase bioavailability and penetration (Saha et al. 2013) [3]. Phytosomes compared to conventional herbal formulations can increase the efficacy of the therapeutic effect due to increased penetration by phosphatidylcholine so that the extract can better penetrate the bilayer lipid membrane, besides that the possibility of the extract contained in the phytosome to break down is also smaller (Ramadon and Mun'im 2016) [4]. Garlic extract (*Allium sativum* L) can be made in a phytosome system using lecithin as a phospholipid bond-forming so it can increase its stability and absorption (Amit et al. 2013)[5]. Phospholipids that are often used in the manufacture of phytosomes are phosphatidylcholine. Phosphatidylcholine is prone to hydrolysis in the aqueous system which can cause chemical instability of the vesicle system such as phytosomes which can further affect the distribution of particle size, surface charge value, permeability, phase, and

pH (Werling et al 2008)[6]. To ensure that the phytosome protects allicin, it is necessary to test chemical stability by determining the rate of the degradation reaction of allicin carried out at temperatures of 4°C, 25°C and 40°C.

Based on this explanation, the purpose of this study was to determine the storage temperature which indicated the slow rate of the reaction of allicin degradation in the phytosome of garlic extract (PGE).

Method

Materials: Spectrophotometer UV-Vis 1601 (SHIMADZU), GCMC-QP2010 (ULTRA-SHIMADZU), particle size analyzer (DELSA MAX), transmission electron microscopy (JEOL JEM-1010), pH meter (LaMotte), oven (MEMMERT), karl fischer (METROHM) and refrigerator (LG). Methanol extract of garlic (*Allium sativum* L) and soy lechytin (LANSIDA), S-Allyl 2-propane-1-sulfinothioate (SIGMA ALDRICH), absolute ethanol, dichloromethane (Pro analysis), potassium dihydrogenphosphate, sodium hydroxide and hydrogen disodium phosphate (MERCK) and aquadest.

Characteristics of garlic extract: Organoleptic was carried out after leaving the viscous extract for 24 hours which included observation of the form, color and odor at room temperature. The form is seen from the extract that is able to flow in a container. Color seen against a white paper background accompanied by lighting. The aroma is smelled by wiping it over the surface of the extract. Determination of water content using 0.05 grams of extract and determined by the Karl Fischer method.

Qualitative test using 100 mg of extract dissolved into 1mL of hexane. Then make allicin calibration standards by dissolving allicin in hexane with dilution variations of 0.125 ppm, 0.25 ppm, 0.5 ppm, 1 ppm and 2 ppm. The sample is injected into the septum by means of a split injection. The type of column used is HP-ULTRA2 agilent. Column oven temperature 800C, injection temperature 2300C for 25 minutes with helium gas mobile phase and the detector using MS (Mass Spectrophotometer).

Yield calculation (Departemen Kesehatan RI 2000) [7] :
$$\text{Yield} = \frac{\text{Extract weights}}{\text{Garlic bulbs weights}} \times 100\%$$

Determination of total ash content (Departemen Kesehatan RI 2011) [8] by using 2g of the extract carefully weighed, and put in a silicate crucible that has been incandescent and tared, then slowly incandescent until the charcoal runs out, cool and weigh. Remove the filter paper along with the rest of the filter in the same crucible. Put the filtrate into the crucible, steam and incandescent until the weight remains. The total ash content is calculated against the weight of the test material expressed in% w / w.

Determination of acid insoluble ash content (Departemen Kesehatan RI 2011) [8] by boiling the ash obtained on the assay of the total ash content with 25 mL dilute hydrochloric acid for 5 minutes. Collect the parts that are insoluble in acid, filter through an ash-free filter paper, wash with hot water, incandescent in a crucible until a fixed weight. The ash content that is insoluble in acid is calculated against the weight of the test material, expressed in% w / w.

PGE (Anwar dan Farhana 2018) [9]: PGE was prepared by complexing phospholipids and methanol extract of garlic (*Allium sativum* L) using a thin layer hydration method. Soy phosphatidylcholine was dissolved with dichloromethane (DCM) while the garlic extract was dissolved with 96% ethanol, then put in a round bottom flask. Dichlorometan is evaporated using a rotary evaporator at 30°C with a speed of 125 rpm, then vacuumed until a thin layer is evenly distributed. The layer was stored in the refrigerator for up to 24 hours at 7°C. The thin layer is hydrated with a phosphate buffer solution pH 5.5. After that, sonication was carried out for 60 minutes.

PGE evaluation: Organoleptic was carried out after leaving the PGE for 24 hours which included observation of the form, color and odor at room temperature. The form is seen from the extract that is able to flow in a container. Color seen against a white paper background accompanied by lighting. The aroma is smelled by wiping it over the surface of the extract.

Density test (Departemen Kesehatan RI 2014) [10] by using a pycnometer. This is done by setting the weight of the empty pycnometer (W0) and the weight of the pycnometer filled with water at a temperature of 25°C (W1). Enter the sample into the pycnometer to remove the excess and weigh (W2). Density of the sample is the result obtained by dividing the sample weight by the weight of water, in a pycnometer at 25°C. Density is calculated by:

$$\rho = \frac{W2 - W0}{W1 - W0}$$

Determination of particle size (PS), polydispersity index (PI), zetta potential (ZP) (Keerthi *et al.* 2014) [11] by using particle size analyzer (PSA). The sample was diluted with aqua pro injection (1 mL of sample mixed with 9 mL of aqua pro injection). The solution is inserted into the flow cell which is then inserted into the instrument. The

device is turned on and the DLS & PALS (Simultaneous) menu is selected. The instrument will measure the sample for 3 minutes, then the PS, PI, and ZP of the PGE vesicles will be measured.

Determination of entrapment efficiency (EE) by using 1mL of PGE was centrifuged to separate the active substance which was not entrapped in PGE at a speed of 10,000 rpm for 60 minutes. The supernatant was taken to measure the content of allicin that was not entrapped in PGE's vesicles. Then the volume is sufficient with a solvent mixture of phosphate buffer pH 6.8 and ethanol 95% to 10 mL, a 0.5 mL pipette then put into a 10 ml measuring flask, the volume is sufficient using a mixed solvent to mark the limit. The solution obtained was measured its absorbance using a spectrophotometer at a maximum wavelength of 214.4 nm. The levels obtained were free allicin levels (FAL). Then to the precipitate was added 0.5 mL of DCM, vortexed for 1 minute, and put into a 10 mL measuring flask and sufficiently volume up to the limit mark. The 0.5 mL pipette is then put into a 10 ml measuring flask, the volume is sufficient using a mixed solvent to the limit mark. The solution obtained was measured for its absorbance using a spectrophotometer. The level obtained is entrapped allicin level (EAL). The percentage of allicin absorbed is determined directly using the formula: $\% EE = \frac{EAL}{EAL + FAL} \times 100\%$

PGE morphology was determined using TEM (transmission electron microscopy). A sample of 1 mL was dissolved in 1 mL of aqua pro injection then vortexed for 1 minute. From this solution, pipette as much as 5 µl and allowed to dry, then dropping 0.5% uranyl acetate (UA). After that the sample is observed under a microscope with various magnifications in accordance with the expected image results.

Chemical stability testing: to see the decrease in the degradation of allicin from PGE using 3 different temperatures, i.e 4°C, 25°C and 40°C. The test was carried out for 8 weeks. The test procedure is the same as the entrapment efficiency. The allicin level obtained was entered into the equation of the zero and first order allicin degradation model

The evaluation which was analyzed statistically was the degradation rate. The data obtained were normally distributed and homogeneous, then analyzed using the 1-way ANOVA test, followed by the Tukey HSD test.

RESULTS AND DISCUSSION

The results of the characteristics of the garlic extract can be seen in **TABLE 1**. Determination of water content aims to provide a maximum limit of the amount of compounds lost in the drying process and to meet the water standard in dried simplicia with a requirement of not more than 12% (Departemen Kesehatan RI 2011) [8]. High water content or more than 12% can be a medium for mold and fungus growth so that it can reduce the quality of simplicia. The low water content is expected to minimize the possibility of simplicia being able to grow molds and fungi so that the extract quality remains good and can be stored for a long time (Putranti et al. 2019) [12]. The water content of the garlic extract obtained was 1.21%, indicating that the water content of the garlic extract was in accordance with the requirements of the Indonesian herbal pharmacopoeia, which was less than 12%.

Determination of the total ash content aims to determine the internal and external mineral content originating from the initial process until the extract is formed. In the process of testing the total ash content, the extract is heated until the organic compounds and their derivatives are digested and evaporated until only the mineral and inorganic elements are left. The total ash content of garlic powder obtained was 3.34%, indicating that the total ash content of the extract was not in accordance with the requirements, i.e not more than 2.7% (Departemen Kesehatan RI 2011) [8]. A high total ash content indicates that the substance contains high metal content.

Determination of acid insoluble ash content aims to determine the residual acid insoluble ash in the form of heavy metals. Acid insoluble ash content reflects the presence of mineral or metal contamination that is not acid soluble in a product. Ash content is insoluble in acid usually contains silicates derived from soil or sand. The amount of dirt, soil, clay and metal elements Ag, Pb and Hg (Putranti et al. 2019) [12]. The acid insoluble ash content of garlic extract obtained was 0.15% indicating that the acid insoluble ash content of the extract was in accordance with the requirements of the Indonesian herbal pharmacopoeia, which is less than 1. Low acid insoluble ash content indicates that the substance contains low internal minerals.

TABLE 1. The characteristics of the garlic extract

| No | Parameter | Result |
|----|-----------|------------------|
| 1. | Form | Viscous extract |
| 2. | Colour | Brown |
| 3. | Odor | Aromatic pungent |

| | | |
|----|----------------------------|---------|
| 4. | Taste | Bitter |
| 5. | Water content | 1,21 % |
| 6. | Total ash content | 3,43 % |
| 7. | Acid insoluble ash content | 0,15 % |
| 9. | Yield | 15,97 % |

The qualitative test results of allicin using GC-MS to determine the content of allicin compounds (S-Allyl-2-Propene-1-Sulfinothioate) based on the total chromatogram ions, especially for volatile compounds. Analysis of the results of the GC-MS chromatogram (**FIGURE 1**) shows that there is a similarity at the peak between garlic extract and allicin standard which is marked by one marker compound at the retention time of 7,722, namely the allicin compound (S-Allyl-2-Propene-1-Sulfinothioate) which is a compound of the organosulfur group.

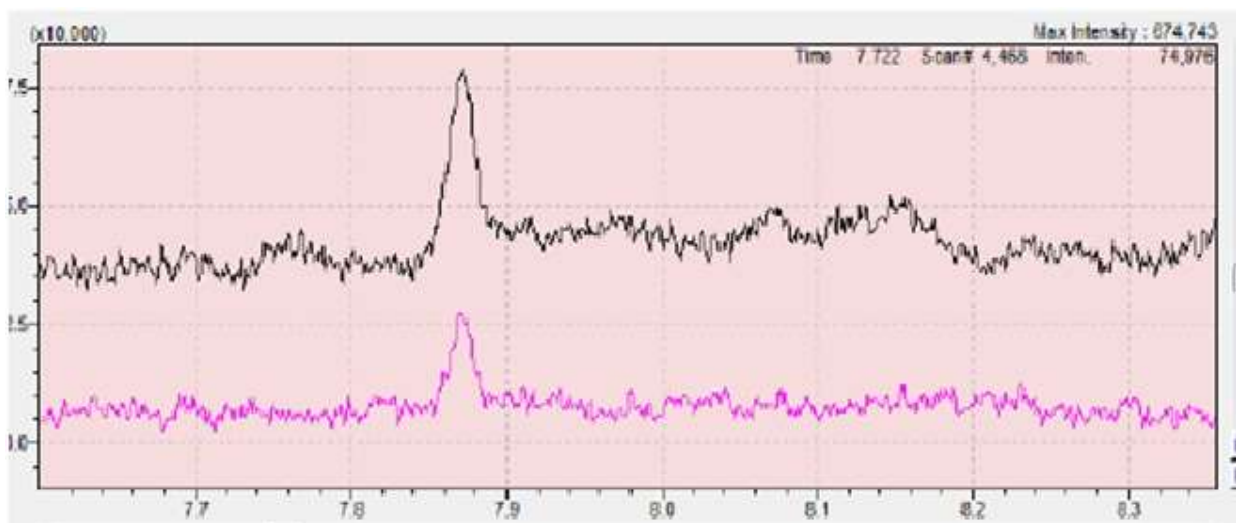


FIGURE 1. GC-MS Chromatography Results: Black chromatogram (sample), pink chromatogram (Allicin standard)

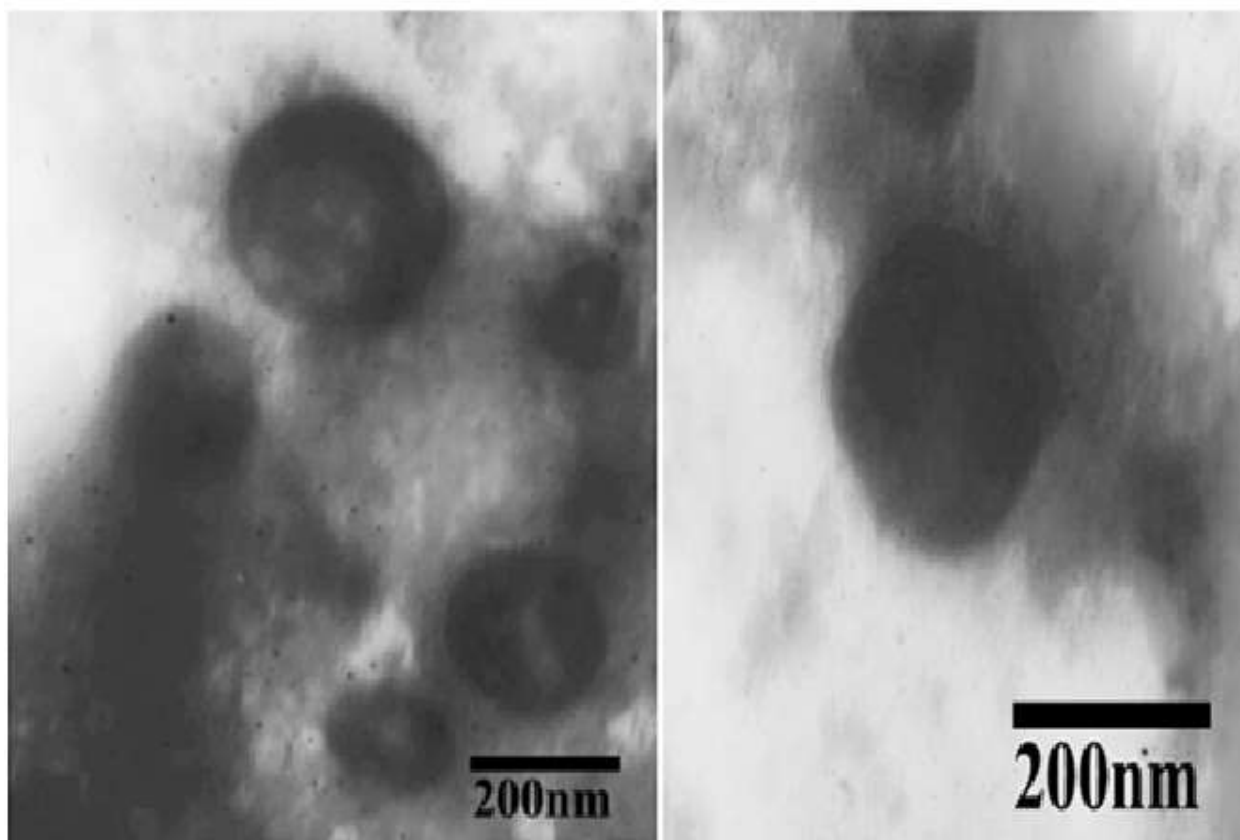
Phytosomes have vesicles that are nanometer in size, with a particle size of 1-300 nm (Agoes 2010) [13]. From the measurement results, it can be seen that the PGE particle size obtained is 270.0 nm (**TABLE 2**), so that the PGE produced is still included in the nanoparticle preparation. The excess of small drug particles can make it easier for drug particles to penetrate the membrane (Dash et al. 2010) [14]. Polydispersity refers to the degree of homogeneity of the particle size. The smaller the PI value then the more homogeneous the nanoparticle dispersion. If the PI value is less than 0.15 the particles are considered homogeneous or monodisperse and if the PI value is greater than 0.35 the particles can be considered non-homogeneous or polydisperse (Anonymous, 2013) [15]. The result of the PGE polydispersity index value is 0.571 so that the phytosome is relatively non-homogeneous. Zeta potential is a measure of the repulsive force between particles. ZP is useful for measuring the charge on the surface of particles. The positive and negative values of ZP indicate the outer charge of the particles of the ionized phospholipid to form OH- when dispersed in aquadest. The value on the surface charge of the particles is useful for describing colloid stability. Nanoparticles with a ZP value close to ± 30 mV are proven to be stable, the stability of the preparation is poor if the zeta potential value is small than 30 and a preparation is said to be stable if the ZP value is greater than 30 (Mardiyadi et al, 2012) [16]. From the data obtained, the ZP value is -32.55 mV, meaning that PGE with a ZP value greater than 30 mV has good stability.

The density was measured to determine the characteristics of the phytosome, the result obtained from the measurement was 1.0208 g / mL. Substances that have a density less than 1.00 g / mL are lighter than water. Substances having a density greater than 1.00 are heavier than water. From the results obtained, PGE has a density slightly greater than water. The determination of allicin EE in PGE was carried out to determine the percentage of allicin entrapped in the phytosome. The evaluation results showed 64.8798%. The result of low entrapment efficiency can be influenced by 2 factors. The first factor is the low allicin content in the garlic extract, this is influenced by the temperature of the solvent evaporation during the extraction process to obtain a viscous extract. The second factor is the conditions for produce phytosomes, including speed, temperature, duration of thin layer formation and during hydration, as well as insufficient lecithin concentration to bind the active substance into the phytosome.

TABLE 2. Result of PGE evaluation

| No | Parameter | Result |
|----|--------------|-------------|
| 1. | Organoleptic | |
| | - color | Brown |
| | - form | Liquid |
| | - aroma | Specific |
| | - taste | Bitter |
| 2. | Density | 1,0051 g/mL |
| 3. | ZP | -32,55 mV |
| 4. | PI | 0,571 |
| 5. | PS | 270 nm |
| 6. | EE | 64,8798 % |

The Transmission Electron Microscope was used to see the vesicle shape and surface morphology of the PGE vesicle. TEM tomography has a greater resolution so that the resulting image can be enlarged. This evaluation provides information on the size of the PGE vesicle at 200nm. TEM is a microscopy technique with the principle of emitting a beam of electrons, interacting with and hitting thin specimens. From the interaction of the transmitted electrons an image is produced which can then be enlarged, focused on an image device such as a film photographic layer. TEM can see morphology, structure to the atomic level. The morphological data obtained with a magnification of 30,000x showed that some vesicles were round but not symmetrical, and there were also regular rounds with varying shapes. The results of the TEM evaluation can be seen in **FIGURE 2**.

**FIGURE 2.** Result of TEM

With the length of storage, there was a decrease in allicin levels in PGE. The reaction will proceed faster if energized from the outside by increasing the temperature. In general, the rate of reaction is doubled for every 10°C increase in temperature. The degradation reaction is faster due to an increase in temperature (Sinko 2015) [17]. The reaction order kinetics of allicin degradation in PGE follows a zero order, where the magnitude of the reaction rate is not influenced by the amount of concentration. The reaction rate of allicin degradation in PGE can be seen in **FIGURE 3**. Meanwhile, the degradation rate of allicin in PGE is at a temperature of 4°C > 25°C < 40°C. At 4°C, the degradation rate of allicin is greater than at 25°C, this happens because of the nature of phosphatidylcholine which will experience separation if stored at temperatures below 10°C (Rowe et al. 2009) [18]. While the degradation rate of 40°C is greater than 25°C, this is in accordance with the literature that the reaction rate increases to two times every 10°C temperature increase (Sinko, 2015) [17]. Previous research has also shown that the higher the storage temperature, the greater the degradation of phosphatidylcholine, the increase in storage temperature will lower the pH of the system which triggers an acid-base catalyst reaction, the addition of buffer can minimize the decrease in system pH thereby slowing down the degradation of phosphatidylcholine (Werling et al., 2008) [6]. In addition to temperature, the length of storage time can increase the optical density so that it can decrease the physical stability of the vesicle system (Yadav et al., 2011) [19].

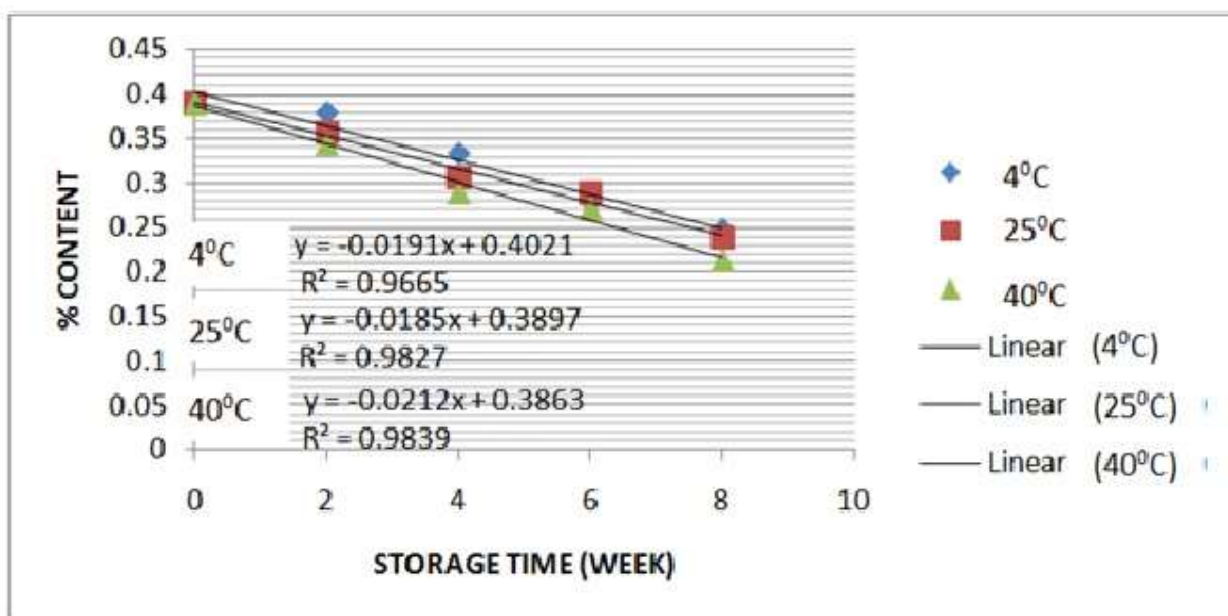


FIGURE 3. Degradation rate of allicin

Based on statistical analysis, evaluation of the degradation rate of allicin in PGE was carried out using one way ANNOVA. The results of the test obtained asymp.Sig. (2-tailed) 0.047. The significance value obtained was <0.05, which means that there was a significant difference in the degradation rate of garlic phytosomes to storage temperature. The Tukey HSD result shows the Sig. 0.047 <0.05, which indicates that there is a significant difference between the degradation rate at 25°C and 40°C.

CONCLUSIONS

Based on the results of the research that has been done, it can be concluded that the reaction rate of the degradation of allicin in the form of PGE is slower at 25°C compared to other temperatures.

REFERENCES

- [1] Setiawan AS, Yulinah E, Adnyana k, Permana H, Sudjana P. 2011. Efek antidiabetes kombinasi ekstrak bawang putih (*Allium sativum*Linn) Dan rimpang kunyit (*Curcumma domestica* Val.) dengan pembanding Glibenklamid pada penderita diabetes mellitus tipe 2. MKB. Vol 43(1): 26-34
- [2] Rana MS, Rohani S, Hossain MN, dan Rahmatullah M. 2018. Improved Glucose Tolerance With A Polyherbal Formulation Of Colocasia Esculenta Tubers And Allium Sativum Cloves. Journal Of Pharmaceutical Research. Vol.7(16): 55-61
- [3] Saha S, Sarma A, Saikia P, Chakrabarty. 2013. Phytosome: A Brief Overview. Journal Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP). Vol 2(1): 12-20
- [4] Ramadon D, Mun'im A. 2016. Pemanfaatan nanoteknologi dalam sistem penghantaran obat baru untuk produk bahan alam. Jurnal ilmu kefarmasian Indonesia. Vol. 14, no. 2: 118-127.
- [5] Amit P, Tanwar YS, Rakesh S, Poojan P. 2013. Phytosome: Phytolipid Drug Delivery System for Improving Bioavailability of Herbal Drug. Journal of Pharmaceutical Science and Bioscientific Research (JPSBR). Vol.3(2): 51-57.
- [6] Werling J, Sabine G, Heather O, Lakshmy N, Thomas G, Phillip W.C. (2008). Physicochemical stability of phospholipid-dispersed suspensions of crystalline itraconazole. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 69: 1104–1113.
- [7] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2000. *Parameter Standar Umum Tumbuhan Obat Bahan Alam*. Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- [8] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2011. *Farmakope Herbal Indonesia*. Edisi II. Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.
- [9] Anwar E, Farhana N. 2018. Formulation and Evaluation of Phytosome-Loaded Maltodextrin-Gum Arabic Microsphere System for Delivery of Camellia sinensis Extract. Journal of Young Pharmacists. Vol. 10(2S): s56-s62
- [10] Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2014. *Farmakope Indonesia*. Edisi V Jakarta: Direktorat Jendral Pengawasan Obat dan Makanan.
- [11] Keerthi B, Pingali PS, Srinivas P. 2014. Formulation and evaluation of capsules of ashwagandha phytosomes. Int J Pharm Sci Rev Res. Vol. 29(2): 138-142
- [12] Putranti W, Maulana A, Fatimah F. 2019. Formulasi Emulgel Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum* L). Jurnal Sains Farmasi dan Klinis. Vol. 6, No.1: 7-15.
- [13] Agoes G. 2010. *Enkapsulasi Farmasetik (SFI-5)*. Bandung : ITB.
- [14] Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. 2010. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. Journal Acta Pol Pharm. Vol. 67(3): 217-222.
- [15] Anonymous. 2013. DelsaMax Analysis Software Instruction For Use Version 1. USA: Beckman Coulter.
- [16] Mardiyadi E, Muttaqien SE, Setyawati DR, Rosidah I, Sriningsih. 2012. Preparasi dan Aplikasi Nanopartikel Kitosan sebagai Sistem Penghantaran Insulin Secara Oral. Prosiding InSINAS MT-25. pp 25-30
- [17] Sinko PJ. 2011. *Martin Farmasi Fisika dan Ilmu Farmasetika edisi 5*. diterjemahkan oleh Tim Alih Bahasa Sekolah Farmasi ITB. Jakarta : EGC.
- [18] Rowe CR, Sheskey JP, Quinn EM. 2009. Handbook of Pharmaceutical Excipients Edisi 6. *The Pharmaceutical Press*. America.
- [19] Yadav A.V , Murthy M.S , Shete A. S* and Sfurti Sakhare. 2011. Stability Aspects of Liposomes. Ind J Pharm Edu Res, Vol 45, Issue 4: 402-413